



**HAL**  
open science

## Filtrage et déconvolution en imagerie de bioluminescence chez le petit animal

Smaïl Akkoul

► **To cite this version:**

Smaïl Akkoul. Filtrage et déconvolution en imagerie de bioluminescence chez le petit animal. Autre. Université d'Orléans, 2010. Français. NNT : 2010ORLE2015 . tel-00585392

**HAL Id: tel-00585392**

**<https://theses.hal.science/tel-00585392>**

Submitted on 12 Apr 2011

**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.



**UNIVERSITÉ D'ORLÉANS**



**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

Institut PRISME ÉQUIPE ISS

**THÈSE** présentée par :  
**Smaïl AKKOUL**

Soutenue le : 22 juin 2010

Pour obtenir le grade de : **Docteur en Sciences et Technologies Industrielles**  
Discipline : **Automatique et traitement du signal**

**Filtrage et déconvolution en imagerie de bioluminescence chez le petit animal**

**THÈSE dirigée par :**  
**Rachid HARBA**

Professeur des Universités, Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**  
**Philippe BOLON**  
**Eric PETIT**

Professeur des Universités, Polytech' Annecy-Chambéry  
Professeur des Universités, Université Paris 12

**JURY :**

**Emmanuel PERRIN** Professeur des Universités, ISTIL - Université Lyon 1,  
Président du jury  
**Philippe BOLON** Professeur des Universités, Polytech' Annecy-Chambéry  
**Eric PETIT** Professeur des Universités, Université Paris 12  
**Alain LE PAPE** Directeur de recherche CNRS, Directeur scientifique du CIPA  
**Rachid HARBA** Professeur des Universités, Université d'Orléans  
**Roger LEDEE** Maître de conférences, Université d'Orléans

# Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer ma gratitude aux personnes qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je remercie tout d'abord Monsieur Philippe BOLON, Professeur à Polytech'Annecy-Chambéry et Monsieur Eric PETIT, Professeur à l'Université de Paris 12 pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également Monsieur Emmanuel PERRIN, Professeur à l'Université de Lyon 1 qui a accepté d'examiner ma thèse.

Je suis reconnaissant envers Monsieur Rachid HARBA, mon directeur de thèse, Professeur à l'Université d'Orléans, pour m'avoir permis de faire un Master Recherche puis cette thèse dans le domaine de la restauration d'images. Sous sa direction, j'ai été initié au métier de chercheur; il m'a inculqué le réflexe d'avoir l'esprit critique et de voir au-delà des apparences.

J'exprime également ma profonde gratitude à mon co-encadrant Monsieur Roger LEDEE, Maître de conférences de l'Université d'Orléans, pour avoir accepté de partager son bureau, son aide, son écoute, sa patience et ses précieux conseils au cours de ces trois ans. Je remercie également Monsieur Rémy LECONGE, Maître de conférences de l'Université d'Orléans, pour son co-encadrement et l'aide qu'il m'a apportée.

Je suis très reconnaissant à Monsieur Alain LEPAPE, Directeur de recherche, Directeur du CIPA au CNRS d'Orléans, à l'origine de ce sujet de thèse, pour avoir mis à notre disposition les données nécessaires à notre travail. Je remercie également Mademoiselle Sabrina PESNEL, Doctorante au CIPA pour sa disponibilité et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée pour la mise en œuvre des expérimentations.

J'adresse également mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont aidé de près ou de loin tout au long de ce travail. Mes premières pensées vont directement à Ahmad ALMHDIE qui était pour moi le modèle à suivre et Rachid JENNANE qui m'a initié à la recherche lors de mon Master. Je rends aussi hommage à tous les enseignants(es) qui ont contribué à ma formation depuis que j'ai intégré l'école primaire dans le petit village où habitent mes parents jusqu'à maintenant.

Toute ma sympathie va aux membres de l'équipe ISS (ex-LESI) de l'institut PRISME que j'ai côtoyé quotidiennement tout au long de ces années. A commencer par les permanents : Meriem, Philippe, Rodolphe, Sylvie, Raphaël, Guy, Rémy, Rachid, Roger, Rachid, Gerald et enfin Christophe Léger notre responsable d'équipe qui montre une disponibilité et une volonté à toute épreuve, qui nous stimule et nous motive. Je salut également les thésards que j'ai croisé pendant ces années et dont certains sont devenus des amis proches : Ahmed, Hazem, Abdenour, Gabriel, Rym, Arnaud, Wael, Lahouaoui, Lotfi, Ali, Vincent et Antony. J'ai beaucoup apprécié le climat de travail qu'ils ont su créer autour de moi.

Mes remerciements s'adressent également à tous mes ami(e)s, ils sont nombreux. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Je remercie particulièrement, ce qui m'ont accueilli et guidé à mon arrivée à Orléans : Nouar, Mourad, Zahir, Nabil, Redouane et Amar.

Mes derniers remerciements vont tout naturellement à ceux qui m'ont soutenu pendant ces longues années d'études, c'est à dire mes parents mon grand frère Belaid et toute ma famille.

Pour finir, un énorme merci à ma femme Sonia qui a su supporter les baisses de moral d'un chercheur souvent égaré voire perdu entre deux raisonnements et pour m'avoir donné la force et la motivation nécessaire pour terminer; ces encouragements me sont allés droit au cœur. Maintenant que j'ai tracé le sillon, je ferai en sorte qu'elle profite de mon expérience pour la thèse qu'elle débute.

## Résumé

Cette thèse est consacrée au traitement d'images de bioluminescence chez le petit animal. Ce type d'imagerie, bien qu'utilisé en routine pour la recherche en cancérologie par exemple, présente néanmoins des problèmes liés aux phénomènes de diffusion et d'absorption par les tissus internes à l'animal. Il s'ajoute à cela le bruit du système d'acquisition ainsi que le bruit lié aux rayonnements cosmiques. Ceci influe sur la qualité des images acquises et rend leur exploitation délicate. Le but de cette thèse est de compenser ces effets perturbateurs. Les travaux menés ont abouti à la proposition d'un modèle de formation des images de bioluminescence ainsi qu'à une chaîne de traitement adaptée composée d'une étape de filtrage suivie d'une étape de déconvolution. Après étude de la nature des différents bruits liés à l'acquisition, nous avons mis au point un nouveau filtre médian pour la suppression du bruit impulsionnel aléatoire présent sur les images acquises ; ce filtre représente le premier bloc de la chaîne proposée. Pour l'étape de déconvolution, nous avons mené une étude comparative de différents algorithmes de déconvolution. Cela a conduit à choisir un algorithme de déconvolution aveugle initialisé avec la réponse impulsionnelle estimée du système d'acquisition. Nous avons validé notre approche globale en comparant les résultats à la réalité terrain. Au travers de différents essais cliniques, nous avons montré que le traitement que nous proposons permet une amélioration significative de la mesure des sources bioluminescentes et une meilleure distinction de sources très proches, ce qui représente un apport non négligeable pour les utilisateurs d'images de bioluminescence.

## Résumé en anglais

This thesis is devoted to analysis of bioluminescence images applied to the small animal. This kind of imaging modality is used in cancerology studies. Nevertheless, some problems are related to the diffusion and the absorption of the tissues of the light of internal bioluminescent sources. In addition, system noise and the cosmic rays noise are present. This influences the quality of the images and makes it difficult to analyze. The purpose of this thesis is to overcome these disturbing effects. We first have proposed an image formation model for the bioluminescence images. The processing chain is constituted by a filtering stage followed by a deconvolution stage. We have proposed a new median filter to suppress the random value impulsive noise which corrupts the acquired images; this filter represents the first block of the proposed chain. For the deconvolution stage, we have performed a comparative study of various deconvolution algorithms. It allowed us to choose a blind deconvolution algorithm initialized with the estimated point spread function of the acquisition system. At first, we have validated our global approach by comparing our obtained results with the ground truth. Through various clinical tests, we have shown that the processing chain allows a significant improvement of the spatial resolution and a better distinction of very close tumor sources, what represents considerable contribution for the users of bioluminescence images.

# Table des matières

Remerciements .....	1
Résumé .....	3
Résumé en anglais .....	4
Table des matières .....	5
Liste des tableaux .....	8
Liste des figures .....	9
Glossaire .....	13
Introduction .....	14
Première partie : <b>Imagerie par bioluminescence</b> .....	18
<b>1 Imagerie par bioluminescence</b> .....	19
1.2 La bioluminescence .....	20
1.2.1 Principe de la réaction de bioluminescence .....	21
1.3 Imagerie de bioluminescence .....	24
1.3.1 Système d'acquisition du signal de bioluminescence .....	27
1.3.2 La caméra CCD .....	28
1.3.3 Caractéristiques électroniques des caméras CCD .....	29
1.3.4 Limitations de la bioluminescence .....	30
1.4 Conclusion .....	31
<b>2 Modélisation des images de bioluminescence</b> .....	33
2.1 Introduction .....	33
2.2 Formation des images de bioluminescence .....	34
2.2.1 Les différents bruits liés à l'acquisition des images de bioluminescence .....	35
2.2.2 Nature des bruits liés à l'acquisition des images de bioluminescence .....	36
2.2.2.1 Test de Normalité .....	36
2.2.2.2 Test de blancheur .....	39
2.2.2.3 Test de stationnarité .....	40
2.2.2.4 Conclusion .....	42
2.3 Le modèle de formation des images de bioluminescence .....	42
2.4 Conclusion .....	43
Deuxième partie : <b>Mise en oeuvre de la chaîne de traitement des images de bioluminescence</b> .....	44
<b>3 Filtrage des images de bioluminescence</b> .....	45

3.1	Introduction .....	45
3.2	Nature du bruit cosmique .....	46
3.2.1	Le bruit impulsionnel poivre et sel.....	47
3.2.2	Le bruit impulsionnel aléatoire uniformément réparti .....	47
3.2.3	Le bruit cosmique.....	47
3.3	Etat de l'art du filtrage pour le bruit impulsionnel .....	48
3.3.1	Mesures de performances.....	56
3.4	Un nouveau détecteur pour le filtre médian commuté .....	57
3.4.1	Calcul de la moyenne pondérée et de l'écart type pondéré .....	58
3.4.2	Sélection des paramètres .....	61
3.4.3	La vitesse de convergence.....	63
3.5	Comparaison du filtre ASWM avec quelques autres méthodes retenues.....	65
3.5.1	Mesures du nombre de pixels mal classés.....	70
3.6	Conclusion.....	73
<b>4</b>	<b>Restauration des images de bioluminescence .....</b>	<b>74</b>
4.1	Introduction .....	74
4.1.1	Etat de l'art de la déconvolution .....	76
4.1.2	Les classes des méthodes de déconvolution.....	77
4.1.2.1	Méthodes linéaires.....	78
4.1.2.2	Méthodes non linéaires.....	81
4.1.2.3	Méthodes statistiques .....	82
4.1.2.4	Méthodes basées ondelettes .....	84
4.1.2.5	Méthodes aveugles .....	85
4.1.3	Conclusion.....	87
4.1.4	Mesure de performances .....	87
4.1.5	La réponse impulsionnelle du système.....	88
4.1.6	Génération des images de synthèse.....	89
4.1.7	Mise en œuvre de la comparaison de différents algorithmes de déconvolution ..	93
4.1.7.1	Rappel des différentes méthodes de déconvolution considérées .....	93
4.1.8	Résultats obtenus en termes d'EQM.....	95
4.1.9	Discussion des résultats obtenus en termes d'EQM.....	101
4.1.10	Evaluation de la qualité de la restauration des intensités .....	102
4.1.10.1	Conclusion.....	104



4.1.10.2	Critère d'arrêt.....	104
4.2	Conclusion.....	105
Troisième partie : <b>Résultats</b> .....		106
<b>5</b>	<b>Validation</b> .....	107
5.1	Introduction.....	107
5.2	Système et protocole d'acquisition d'images de bioluminescence.....	108
5.2.1	Système d'acquisition.....	108
5.2.2	Protocole expérimental.....	109
5.3	Validation de la chaîne.....	109
5.3.1	Validation du filtre.....	109
5.3.2	Validation de la méthode de déconvolution retenue.....	114
5.4	Conclusion.....	117
<b>6</b>	<b>Applications en cancérologie expérimentale</b> .....	119
6.1	Introduction.....	119
6.2	Analyse de métastases.....	120
6.2.1	Première souris.....	120
6.2.2	Deuxième souris.....	122
6.2.3	Troisième souris.....	123
6.2.4	Quatrième souris.....	124
6.3	Analyse de tumeurs osseuses et pulmonaires.....	126
6.4	Conclusion.....	129
<b>Conclusion</b> .....		130
<b>Bibliographie</b> .....		133
<b>Annexes</b> .....		138

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Différents couples enzyme-substrat utilisés en imagerie de bioluminescence. .	24
Tableau 2.1 : Résultats obtenus pour un exemple d'échantillon de bruit sélectionné sur une image de bioluminescence. ....	39
Tableau 3.1 : PSNR (dB) et MAE pour une probabilité de 30% de bruit impulsionnel aléatoire. Les meilleurs résultats sont donnés en caractères gras. ....	66
Tableau 3.2: Les résultats de comparaison de la détection du bruit pour l'image "Lena" corrompue par un bruit impulsionnel aléatoire. Les meilleurs résultats sont en caractères gras. ....	71
Tableau 4.1 : Récapitulatif des différentes méthodes de déconvolution prise en compte dans cette étude comparative. ....	94
Tableau 4.2 : EQM minimal obtenu pour chacune des méthodes considérées FI : Filtre Inverse, W : Wiener, TM : Tikhonov Miller, GM : Golden Meinel, PGP : Plus Grande Pente, GC : Gradient Conjugué, LR : Lucy Richardson, MAP : Maximum a posteriori, SMART : Simultaneous Multiplicative Algebraic Restoration, MV : Maximum de vraisemblance, DEQUANT.....	97
Tableau 4.3 : Résultat de la restauration obtenue pour la première image de synthèse par les différentes méthodes. ....	98
Tableau 4.4 : Résultat de la restauration obtenue pour la deuxième image de synthèse par les différentes méthodes. ....	100
Tableau 4.5 : Intensité moyenne ainsi que l'écart type correspondant obtenus pour chacune des méthodes dans la région d'intérêt choisie sur l'image de synthèse. ....	103
Tableau 5.1 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la restauration du lot de sept images de bioluminescence, (a) Image visible de la tumeur après ablation de la peau (b) Image de bioluminescence de la tumeur, (c) même image de bioluminescence après filtrage et déconvolution. ....	116
Tableau 5.2 : Mesures des surfaces ( $\text{mm}^2$ ) : $A_1$ sur images macroscopiques, $A_2$ et $A_3$ sur images de bioluminescence avant et après restauration respectivement. Erreurs relatives (en %) $\text{Err}_1$ et $\text{Err}_2$ : avant et après restauration. ....	117
Tableau 6.1 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 1. ....	121
Tableau 6.2 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 2. ....	123
Tableau 6.3 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 3. ....	124
Tableau 6.4 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 4. ....	125

## Liste des figures

Figure 1.1: Exemples d'organismes bioluminescents, (a) une luciole, (b) des champignons, (c) des organismes marins. (Sources : <a href="http://www.lemensuel.net">http://www.lemensuel.net</a> , <a href="http://news.nationalgeographic.com">http://news.nationalgeographic.com</a> , <a href="http://oceanexplorer.noaa.gov">http://oceanexplorer.noaa.gov</a> ).....	21
Figure 1.2 : Principe de la réaction de bioluminescence (source Wikipédia). .....	21
Figure 1.3 : Mesure du spectre d'émission in vitro et in vivo de la luciférase de luciole pour des cellules tumorales de prostate (PC- 3M-luc). Les mesures ont été relevées pour des tumeurs sous cutanées sur des souris Nude. ....	23
Figure 1.4 : Principe de mise en œuvre de la bioluminescence pour l'infectiologie. ....	25
Figure 1.5 : Principe de mise en œuvre de la bioluminescence pour la cancérologie.....	26
Figure 1.6 : Principe de mise en œuvre de la bioluminescence pour la thérapie génique.....	26
Figure 1.7 : (a) Principe du système d'acquisition en imagerie de bioluminescence, (b) Exemple d'acquisition de bioluminescence, (c) Image de la souris acquise avec éclairage, (d) Fusion de l'image de bioluminescence et de l'image acquise lorsque la souris est éclairée.....	27
Figure 1.8 : Système utilisé pour l'acquisition des images de bioluminescence (Hamamatsu Macroscopic Imaging AEQUORIA system).....	28
Figure 1.9 : Spectre de sensibilité de la caméra CCD (ORCA2 BT 512 HAMAMATSU <sup>®</sup> ) munie du capteur C4742-98-26LA.....	29
Figure 2.1: Illustration de la diffusion et l'absorption du signal lumineux dans les tissus.....	34
Figure 2.2: Exemple d'image de bioluminescence en 3D d'une zone où il n'y a que du bruit présent. ....	36
Figure 2.3: Représentation sous forme d'histogramme des intensités des niveaux de gris d'une zone ne contenant que du bruit d'une image de bioluminescence. ....	37
Figure 2.4: Exemple d'échantillon de niveaux de gris de bruit prélevé dans une zone ne contenant que du bruit sur une image de bioluminescence. ....	40
Figure 2.5: Exemple d'échantillon de bruit prélevé dans une zone ne contenant que du bruit sur une image de bioluminescence. ....	41
Figure 2.6: Echantillon précédent scindé en Q segments de taille 5.....	42
Figure 3.1 : Exemple d'une image de bioluminescence représentée sous forme d'intensité pour la mise en évidence de l'effet des rayons cosmiques.....	46
Figure 3.2 : (a) Image d'une acquisition de bioluminescence entachée de cosmiques, (b) même image après filtrage médian. ....	48

Figure 3.3 : Exemple de mise en œuvre du filtre médian pour une fenêtre d'observation de 3x3.....	49
Figure 3.4 : Exemples de formes de fenêtre de filtrage possibles.....	49
Figure 3.5 : Exemple de filtrage médian (a) Image dégradée avec un bruit aléatoire avec une probabilité de 20%, (b) Résultat du filtrage avec un filtre médian de 3x3.....	50
Figure 3.6 : Les quatre directions principales. ....	54
Figure 3.7 : Exemple de deux échantillons d'une fenêtre 3x3 qui contiennent un pixel corrompu. Les valeurs des niveaux de gris des pixels sont représentées sur ces deux graphiques. Les lignes rouges représentent la moyenne standard pour chacun des neuf pixels de la fenêtre. La ligne verte représente la moyenne pondérée....	57
Figure 3.8 : Exemple de deux fenêtres d'observation : dans le cas (a) le pixel central n'est pas bruité mais la fenêtre contient un pixel bruité, dans le cas (b) le pixel central est bruité.....	60
Figure 3.9 : Valeurs de $\sigma_w$ pour l'image Lena.....	61
Figure 3.10 : Résultats en termes de PSNR en fonction du nombre d'itérations du filtrage itératif ASWM pour différentes images dégradées sur 20% de ses pixels (bruit impulsionnel aléatoire).....	64
Figure 3.11 : Résultats en termes de PSNR en fonction du nombre d'itérations du filtrage itératif ASWM pour différentes images dégradées sur 40% de ses pixels (bruit impulsionnel aléatoire).....	64
Figure 3.12 : Comparaison des performances des différentes méthodes de filtrage de l'image "Peppers" dégradée par différents niveaux de bruit impulsionnel aléatoire.....	66
Figure 3.13 : Comparaison des performances de restauration des méthodes considérées sur l'image "Goldhill" dégradée avec du bruit impulsionnel aléatoire sur 30% de ces pixels. ....	68
Figure 3.14 : Comparaison des performances de restauration des méthodes considérées sur l'image "Peppers" dégradée avec du bruit impulsionnel aléatoire sur 40% de ces pixels. ....	69
Figure 3.15 : Comparaison des performances de restauration sur l'image "Lena" dégradée de 30% de bruit impulsionnel aléatoire ; seul, une partie de l'image "Lena" est montrée pour mieux visualiser la qualité de la restauration.....	72
Figure 4.1 : synoptique de formation d'une image dans le domaine de Fourier sans prise en compte du bruit.....	78

Figure 4.2 : Synoptique de formation d'une image dans le domaine de Fourier avec prise en compte du bruit.....	79
Figure 4.3 : Schéma du dispositif expérimental pour relever la réponse impulsionnelle du système. ....	89
Figure 4.4 : Zoom (40 x) sur l'image de la PSF relevée expérimentalement. ....	89
Figure 4.5 : Illustration des deux images de synthèse utilisées pour la simulation de sources de bioluminescence. ....	90
Figure 4.6 : Processus de génération d'une image de synthèse pour l'imagerie de bioluminescence. ....	91
Figure 4.7 : Deuxième image de synthèse avant et après dégradation.....	92
Figure 4.8 : Illustration de l'effet de Poisson sur l'image de synthèse ainsi que l'ajout d'un bruit Gaussien. ....	93
Figure 4.9 : Mesures de performance en termes d'EQM en fonction des itérations pour chacune des méthodes de restauration itératives considérées. GM : Golden Meinel, PGP : Plus Grande Pente, GC : Gradient Conjugué, LR : Lucy Richardson, MAP : Maximum a posteriori, SMART : Simultaneous Multiplicative Algebraic Restoration, MV : Maximum de vraisemblance (aveugle), DEQUANT. ....	95
Figure 4.10 : Courbes de performance en termes d'EQM en fonction des itérations pour les méthodes PGP, GM et GC. ....	96
Figure 4.11 : Courbes de performance en termes d'EQM en fonction des itérations pour les méthodes statistiques, basées ondelettes et aveugles. ....	97
Figure 4.12 : Valeur moyenne des intensités de la région d'intérêt obtenues pour chaque itération.....	103
Figure 4.13 : Ecart type des intensités de la région d'intérêt obtenu pour chaque itération ..	103
Figure 5.1 : Image du système d'acquisition Hamamatsu (Macroscopic Imaging AEQUORIA system).....	108
Figure 5.2 : Exemple 1 d'image de bioluminescence (a) image en fausses couleurs, (b) même image sous forme d'intensités (c) image obtenue avec le filtre ASWM. ....	111
Figure 5.3 : Exemple 2 d'image de bioluminescence (a) image en fausses couleurs, (b) même image sous forme d'intensités (c) image obtenue avec le filtre ASWM. ....	112
Figure 5.4 : Exemple 3 d'image de bioluminescence (a) image en fausses couleurs, (b) même image sous forme d'intensités (c) image obtenue avec le filtre ASWM. ....	113

Figure 5.5 : Image de bioluminescence en niveau de gris, même image en fausses couleurs. .....	115
Figure 6.1 : Superposition de l'image visible de la souris 1 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesures sur les tumeurs.....	120
Figure 6.2 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 1 à l'image de bioluminescence traitée en fausses couleurs. (b) Labellisation des foyers lumineux sélectionnés par l'expert.....	121
Figure 6.3 : Superposition de l'image visible de la souris 2 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesures sur les tumeurs.....	122
Figure 6.4 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 2 à l'image de bioluminescence restaurée représentée en fausses couleurs. (b) Labellisation de chaque foyer lumineux.....	122
Figure 6.5 : Superposition de l'image visible de la souris 3 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesure sur les tumeurs. ....	123
Figure 6.6 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 3 à l'image de bioluminescence restaurée en fausses couleurs, (b) Labellisation de chaque foyer lumineux. ....	124
Figure 6.7 : Superposition de l'image visible de la souris 4 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesures sur les tumeurs.....	124
Figure 6.8 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 4 à l'image de bioluminescence restaurée en fausses couleurs. (b) Labellisation de chaque foyer lumineux. ....	125
Figure 6.9 : Image de bioluminescence acquise.....	127
Figure 6.10 : Image avant restauration fusionnée avec l'image optique. ....	127
Figure 6.11 : (a) Image avant traitement, (b) même image restaurée avec la chaîne.....	128
Figure 6.12 : Image restaurée avec la chaîne fusionnée avec l'image optique.....	128

## Glossaire

**Bioluminescence** : Production et émission de lumière par un organisme vivant.

**Souris Nude** : Souris immunodéprimée (défenses immunitaires affaiblies) tolérant des tumeurs d'origines humaines et naturellement sans poils.

**ATP** : L'adénosine triphosphate est une molécule utilisée chez tous les organismes vivants pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques.

**Gène rapporteur** : Gène que l'on rajoute à un gène d'intérêt dans une construction génétique afin de visualiser la protéine recombinante produite.

**Le péritoine** : Fine membrane qui tapisse la cavité abdominale et l'extérieur des viscères contenus par cette cavité.

**Milieu anaérobie** : Milieu où il n'y a pas présence de dioxygène (O<sub>2</sub>).

**Oncologie ou carcinologie ou cancérologie** : Spécialité médicale d'étude, de diagnostic et de traitement des cancers.

# Introduction



Les recherches sur le génome ont mis en évidence que l'être humain et le règne animal ont une part non négligeable de gènes en commun. C'est le cas des petits mammifères, notamment la souris, dont 95% du génome est identique à celui de l'homme. De par son faible coût, sa facilité de maintien, son cycle de reproduction court et la facilité de modification de son génome, la souris est devenue le principal modèle pour la compréhension de l'expression des gènes et de leur implication dans les maladies. La tendance actuelle est centrée sur l'étude des mécanismes de maladies humaines en les reproduisant dans les modèles animaux. Ces modèles sont aussi utilisés dans la recherche moléculaire, toxicologique et pharmacologique. Ils sont créés par exemple pour étudier le mode d'action et la toxicité de nouvelles molécules dédiées au traitement des tumeurs ou des maladies cardiovasculaires ou pour reproduire des maladies humaines comme le diabète.

Cependant, le développement de ces modèles doit trouver son équivalent instrumental et méthodologique. Ainsi, pour l'évaluation des modifications physiologiques du petit animal, il n'est plus question aujourd'hui de recourir à sa dissection pour l'examen des tissus sous microscope comme cela a été d'usage pendant longtemps. Cette méthode destructive exige le sacrifice d'un nombre important d'animaux pour avoir un résultat statistique significatif et elle ne permet pas un suivi du même animal dans le temps. Dans ce contexte, il est nécessaire de mettre au point des dispositifs d'imagerie *in vivo* chez le petit animal. De par la différence de taille entre la souris et l'homme, l'imagerie de la souris présente plusieurs défis technologiques. Un effort important a été fait pour adapter ou développer des systèmes dédiés aux études chez le petit animal. Ainsi, au cours de ces dernières années, l'imagerie biologique et médicale pour le petit animal a connu un essor considérable.

Une partie des imageurs dédiés au petit animal est en général une adaptation, une miniaturisation des appareillages utilisés pour l'homme. Cette miniaturisation est le plus souvent associée à des ruptures technologiques destinées à optimiser à la fois la résolution et la sensibilité pour obtenir chez un animal de 20 grammes un examen avec les mêmes performances comparatives que chez l'homme. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) a été l'une des premières modalités adaptée au rat et à la souris. Les autres modalités comme la radiographie X et l'échographie pour l'imagerie anatomique se sont également adaptées. Les techniques d'imagerie fonctionnelle comme la scintigraphie ou la tomographie par émission de positrons (TEP) ont également bénéficié d'avancées technologiques permettant de visualiser ou de suivre la fixation d'une molécule dans les différents organes ou l'efficacité d'un traitement. En plus de l'adaptation de modalités existantes au petit animal, des

techniques d'imagerie dédiées ont vu le jour. Ainsi, les recherches dans ce domaine ont conduit à l'émergence de nouvelles modalités d'imagerie optique *in vivo* comme l'imagerie de fluorescence qui s'appuie sur la détection de fluorochromes après excitation transcutanée par un laser. C'est aussi le cas de l'imagerie par bioluminescence qui permet à la fois d'avoir une information métabolique et fonctionnelle. Le principe de cette imagerie repose sur l'utilisation de cellules génétiquement modifiées émettant naturellement des photons après interaction avec un substrat donné. Ces principes d'imagerie permettent une visualisation de l'expression génique et sont une voie prometteuse pour la thérapie génique, la cancérologie et l'infectiologie.

Un des grands intérêts de l'imagerie de bioluminescence est sa simplicité de mise en œuvre. La détection est effectuée par une simple caméra CCD refroidie. Un autre avantage est la résolution temporelle élevée qui permet l'étude de phénomènes cinétiques rapides. Cette imagerie présente aussi l'avantage d'être non invasive ce qui permet la visualisation, le suivi et la caractérisation de tumeurs. Bien que l'imagerie par bioluminescence soit prometteuse et incontournable, la lumière émise par les sources bioluminescentes est faible, voire très faible, et subit des phénomènes de diffusion et d'absorption dans les tissus, ce qui va induire un flou dans les images résultantes. De plus, comme tout système d'acquisition, un bruit va venir perturber la mesure. Pour une exploitation de ces images, il apparaît donc nécessaire de traiter ces images pour pallier les phénomènes intervenant lors de l'acquisition. A notre connaissance, il n'y a pas de travaux menés sur ce type d'imagerie.

Dans ce travail, nous proposons de développer des méthodes de traitement efficaces pour améliorer la résolution et le contraste d'images de bioluminescence tout en ayant à l'esprit que ces traitements ne doivent en aucun cas altérer l'information contenue dans l'image et que les temps de traitement doivent rester raisonnables.

Au niveau national et international, des laboratoires privés et publics sont en train de s'équiper de plates-formes d'imagerie animale regroupant différentes modalités. C'est le cas en Région Centre du CIPA (Centre d'Imagerie du Petit Animal) du CNRS d'Orléans qui est par ailleurs très impliqué dans le pôle régional d'imagerie qui regroupe les équipes universitaires et les principaux organismes. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette thèse qui se propose de repousser les limites de l'imagerie par bioluminescence par le biais de la mise au point d'outils de traitement d'images qui permettront d'éliminer ou du moins réduire les effets

non désirés induits lors de l'acquisition des images, notamment l'effet de flou et la diffusion du signal lumineux ainsi que la présence de bruit.

La thèse est organisée comme suit :

### **Première partie : Imagerie par bioluminescence.**

Cette partie, est composée de deux chapitres. Dans le premier chapitre, nous présentons le principe physique de la bioluminescence dans la nature et l'intérêt que lui a porté l'homme au fil du temps pour finir par son adaptation à faire de l'imagerie in-vivo non invasive. Le deuxième chapitre quant à lui, est consacré à l'étude de la formation des images de bioluminescence et de la nature des différents bruits liés à l'acquisition des images de bioluminescence. Un modèle de formation adapté à cette imagerie est alors proposé.

### **Deuxième partie : Mise en œuvre de la chaîne de traitement d'images de bioluminescence.**

Cette deuxième partie, est aussi composée de deux chapitres. Elle est consacrée à l'étude et à la proposition d'une chaîne de traitement pour les images de bioluminescence. Cette chaîne est composée de deux blocs. Dans le premier chapitre, il est fait un état de l'art des différentes méthodes de filtrage du bruit impulsionnel, pour définir un nouveau filtre qui composera le premier bloc de la chaîne. Le deuxième chapitre, présente la deuxième partie de la chaîne de traitement qui est la partie déconvolution. Dans ce chapitre, une étude comparative est menée sur différentes méthodes de déconvolution après un classement de ces méthodes. Cette étude comparative sur des images de synthèse générées à l'aide du modèle de formation défini au chapitre deux de la première partie permettra la sélection de la méthode la plus adaptée aux images de bioluminescence.

### **Troisième partie : Résultats**

Cette partie a pour but la validation de la chaîne de traitement proposée sur des acquisitions d'images de bioluminescence réelles et présente quelques expérimentations menées en cancérologie expérimentale. Dans un premier temps la chaîne de traitement que nous proposons sera validée par comparaison avec la réalité terrain. Dans un deuxième temps quelques applications en cancérologie expérimentale montreront l'intérêt de ce travail.

Première partie :

**Imagerie par bioluminescence**

# 1 Imagerie par bioluminescence

***Résumé :** Après avoir vu dans un premier temps le principe de la bioluminescence et sa manifestation dans la nature chez des organismes vivants, dans un second temps, nous détaillerons le principe physique mis en jeu lors de la réaction de bioluminescence. Par la suite, nous verrons comment cette faculté naturelle à émettre de la lumière a été adaptée pour en faire une modalité d'imagerie. Puis une large partie de ce chapitre sera consacrée au principe d'acquisition et aux caractéristiques instrumentales de cette modalité. Enfin, nous présenterons les atouts et les limites de cette technique.*

## 1.1 Introduction

Les deux dernières décennies ont vu de grandes avancées en biologie moléculaire ainsi que le développement de modèles de maladies humaines à base de petits animaux, notamment les modèles murins (souris). Ces avancées ont nécessité l'adaptation de modalités d'imagerie existantes afin de répondre aux spécificités de ces modèles en termes de taille et de tolérance aux effets secondaires, comme les radiations par exemple. De nouvelles modalités d'imagerie spécifiques au petit animal ont été également développées. Parmi celles-ci, on trouve l'imagerie optique par bioluminescence qui rencontre aujourd'hui un grand succès auprès de la communauté de l'imagerie du petit animal. Elle présente une grande sensibilité au phénomène observé avec une résolution temporelle élevée ce qui permet le suivi de phénomènes cinétiques rapides. La rapidité d'acquisition permet également de visualiser l'évolution de phénomènes sur un grand nombre de sujets et ceci avec un faible coût et une facilité de mise en œuvre.

## 1.2 La bioluminescence

L'émission de lumière par des organismes vivants a fasciné les hommes depuis la nuit des temps (Shimomura '06). Aristote (348-322 av. J.-C.) est le premier à mentionner la lumière froide émise par des poissons morts et par des moisissures. Pline (23-79 apr. J.-C.) fait la description de plusieurs organismes luminescents dans son "Historia naturalis". Ainsi, ce phénomène était le sujet de recherche d'un bon nombre de grands chercheurs de domaines variés, comme les naturalistes, les physiciens et les physiologistes. Le terme bioluminescence est, à l'origine, un mot composé de deux parties, le terme grec *bios* signifiant vie et le terme latin *lumen* signifiant lumière. Raphaël Dubois (1849-1929) découvre en 1887 que la bioluminescence met en jeu trois composés : un composé organique oxydable qu'il nomma luciférine, une enzyme spécifique qu'il nomma luciférase et de l'oxygène. Cependant, les secrets de la chimie de la bioluminescence ne seront découverts qu'au vingtième siècle. Eilhardt Wiedemann (1888) a créé le terme « luminescence » qui signifie émission de lumière froide. Harvey (1916) a utilisé pour la première fois le terme « bioluminescence » pour désigner la luminescence d'organismes vivants.

Dans la nature, on trouve une multitude d'animaux et de plantes qui émettent naturellement de la lumière (Figure 1.1). Cette lumière, émise par ces organismes vivants, est utilisée pour différentes tâches. On distingue quatre fonctions principales (Greer et Szalay '02) :

- l'éclairage
- la prédation,
- la protection,
- la communication.

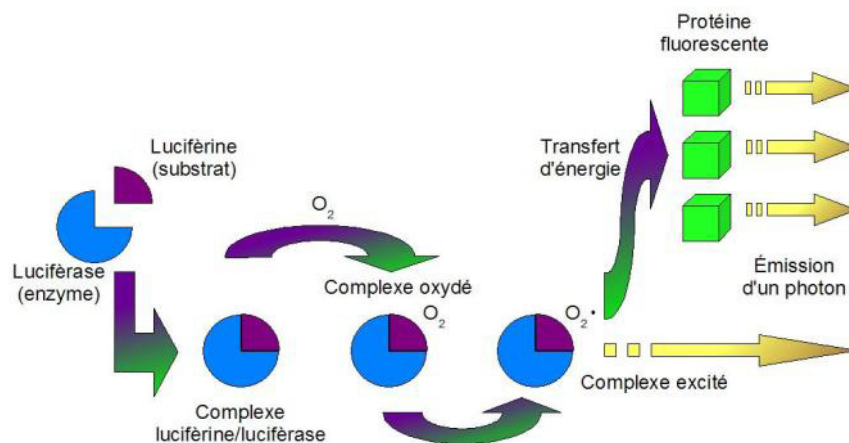
Concernant l'éclairage, l'émission de lumière permet soit de s'éclairer ou d'illuminer les proies. Pour la prédation, l'animal utilise l'effet lumineux pour attirer ses proies. Pour effrayer ses prédateurs, l'organisme bioluminescent peut émettre des éclairs lumineux inattendus. Enfin, la lumière émise peut être utilisée pour communiquer et plus particulièrement lors des parades nuptiales.



**Figure 1.1: Exemples d'organismes bioluminescents, (a) une luciole, (b) des champignons, (c) des organismes marins. (Sources : <http://www.lemensuel.net>, <http://news.nationalgeographic.com>, <http://oceanexplorer.noaa.gov>).**

### 1.2.1 Principe de la réaction de bioluminescence

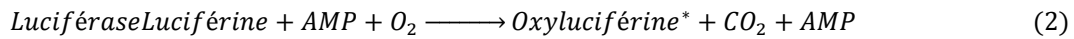
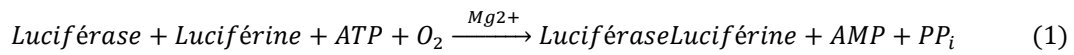
La lumière émise par bioluminescence résulte d'une réaction de chimiluminescence. Cette réaction a pour effet l'oxydation de la luciférine par de la luciférase (Figure 1.2).



**Figure 1.2 : Principe de la réaction de bioluminescence (source Wikipédia).**

Les termes luciférine et luciférase sont des termes génériques (Shimomura '06). Ainsi les recherches ont montré qu'il existe dans la nature différentes molécules organiques oxydables ayant la faculté d'émettre de la lumière et qu'à chacune de ces molécules correspond une enzyme spécifique. Ainsi, chez la luciole *Photinus pyralis*, qui est l'animal où le phénomène de bioluminescence a été le plus étudié, l'enzyme de luciférase catalyse la réaction de

bioluminescence en présence d'ATP<sup>1</sup> (Adénosine Triphosphate ; molécule d'énergie) selon la réaction suivante :

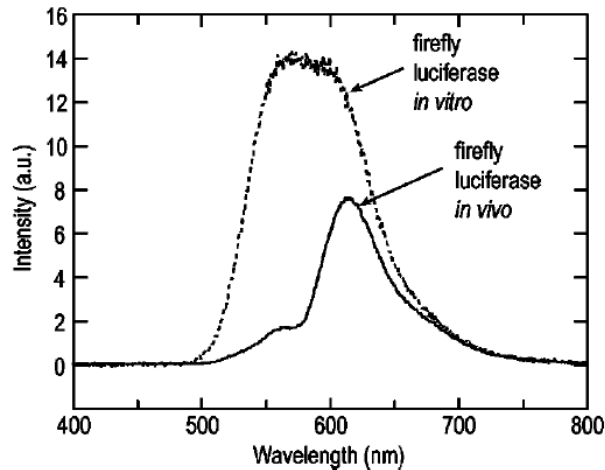


La réaction de l'enzyme luciférase et du substrat luciférine a lieu en présence de magnésium, d'oxygène et d'ATP. Cette réaction conduit à la formation d'un oxyluciférine à l'état électroniquement excité (instable). Le retour de l'oxyluciférine à son état stable est accompagné d'une libération d'énergie sous forme d'une onde lumineuse. Le nombre de photons émis est proportionnel au nombre de molécules de luciférase présentes dans l'organisme. Ainsi, la luciole est capable de réguler son émission de lumière par cette enzyme. La Figure 1.3 montre le spectre d'émission de la luciférase de luciole in-vivo (lumière émise par les cellules bioluminescentes internes à l'animal en présence de luciférase) et in-vitro (lumière émise par des cellules bioluminescentes en éprouvettes en présence de luciférase) (Rice et al. '01). Les mesures ont été relevées pour des tumeurs de prostate. Les courbes obtenues représentées dans la Figure 1.3 montrent que le pic du spectre in-vivo, de la luciférase de luciole, est atténué et décalé vers le proche infra rouge par rapport au spectre in-vitro. Cela est dû à l'absorption d'une partie de la lumière émise par les tissus traversés. Ainsi, les longueurs d'ondes les plus absorbées sont celles inférieures à 600 nm, spectre caractéristique d'absorption de l'hémoglobine (Rice et al. '01).

---

<sup>1</sup> L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule utilisée chez tous les organismes vivants pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques. (Source : Biologie moléculaire de la cellule, par Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, James Darnell, Chris A. Kaiser, Pierre L. Masson).





**Figure 1.3 : Mesure du spectre d'émission in vitro et in vivo de la luciférase de luciole pour des cellules tumorales de prostate (PC- 3M-luc). Les mesures ont été relevées pour des tumeurs sous cutanées sur des souris Nude.**

Il était donc admis au début des années 1960 que la réaction de bioluminescence était causée par l'interaction luciférine-luciférase. Cette conviction a été remise en cause avec la découverte, en 1962 par Shimomura et al. (Shimomura '06), d'une protéine bioluminescente chez les méduses appelée Aequorine. Leurs recherches ont montré que pour émettre de la lumière l'Aequorine (protéine bioluminescente) utilise un mécanisme différent du schéma classique luciférase-luciférine défini pour la bioluminescence. Cette protéine émet de la lumière dans des solutions aqueuses par simple ajout de calcium  $Ca^{2+}$ , et cela en présence ou en absence d'oxygène. La lumière est émise à la suite d'une réaction intermoléculaire de protéines et sa quantité est proportionnelle à la quantité de protéines utilisées. Au départ, cela a été considéré comme étant une exception de la nature, mais par suite de la découverte d'une autre protéine lumineuse chez le ver Chaetoptère (cheatopterus) en 1966, et en considérant la possibilité de trouver d'autres protéines lumineuses, *Shimomura et al* ont proposé un nouveau terme (photoprotéine) pour désigner ces protéines inhabituelles (Shimomura '06). En octobre 2008, le prix Nobel de chimie a été attribué à Shimomura et al, pour leurs travaux sur la bioluminescence, notamment pour la découverte et le développement de la photoprotéine (protéine GFP : Green Fluorescent Protein).

Parmi l'ensemble des couples enzyme-substrat que l'on trouve dans la nature ayant la capacité de générer un signal de bioluminescence, seul un nombre restreint a été développé

et utilisé comme gène rapporteur<sup>2</sup>. Ainsi, les principaux couples enzyme-substrat utilisés en imagerie optique sont présentés dans le Tableau 1.1.

**Tableau 1.1 : Différents couples enzyme-substrat utilisés en imagerie de bioluminescence.**

Organisme	Enzyme	Substrat	Co substrat/ Catalyseur
Luciole ( <i>photinus pyralis</i> ) Bactérie Dinoflagellé	Luciférase	Luciférine	ATP
Méduse ( <i>aequorea victoria</i> )	Aequorine	Coelentérazine	Ca <sup>2+</sup>
Pensée de mer ( <i>renilla reniformis</i> )	Luciférase	Coelentérazine	Aucun

Il n'en reste pas moins que diverses réactions sont utilisées pour la mise en place de processus d'imagerie. Nous allons nous focaliser sur le couple luciférine- luciférase qui sera utilisé dans notre travail.

Le gène codant la luciférase est obtenu de lucioles d'Amérique du nord (*Photinus Pyralis*). Dans sa configuration de base, l'enzyme produit de la lumière dont le spectre d'émission présente un pic aux alentours de 560 nm et englobe une partie significative de la lumière au dessus de 600 nm (Figure 1.3). Il est donc particulièrement adapté à l'imagerie in-vivo (Contag et Bachmann '02). Ce gène a fait l'objet de multiples modifications génétiques, qui ont pour effet l'amélioration de son expression dans les cellules mammifères (Contag et Bachmann '02). D'autres modifications ont été apportées à la luciférase de luciole comme la substitution d'acides aminés qui a pour effet de changer la longueur d'onde d'émission vers la région rouge du spectre visible, c'est à dire au dessus de 600nm. Ce spectre est particulièrement bien adapté à la bande passante d'une caméra CCD classique.

### 1.3 Imagerie de bioluminescence

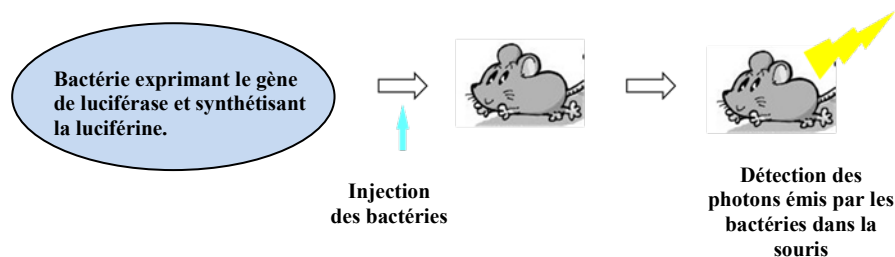
L'imagerie de bioluminescence est une technologie (Rice et al. '01; Greer et Szalay '02 ; Sadikot et Blackwell '05; Zinn et al. '08) utilisée dans un large éventail d'études biologiques pour la recherche chez le petit animal. Cette imagerie optique in vivo est basée sur la

---

<sup>2</sup> Un gène rapporteur est un gène que l'on rajoute à un gène d'intérêt dans une construction génétique afin de visualiser la protéine recombinante produite. (Source : Introduction à l'analyse génétique Par Anthony J. F. Griffiths, David T. Suzuki, Chrystelle Sanlaville).

détection de la lumière émise lorsque l'enzyme luciférase est catalysée par le substrat luciférine (Rice et al. '01). Elle est exploitée notamment en infectiologie, en cancérologie et en thérapie génique.

Elle a été tout d'abord développée en utilisant un modèle d'infection bactérien (Contag et Bachmann '02). Des bactéries exprimant le gène de luciférase sont utilisées pour infecter des modèles animaux. Le gène de la luciférase est associé aux bactéries par un procédé biochimique complexe. Lors du développement bactérien, il y aura également développement du gène de la luciférase et donc une réaction de bioluminescence que l'on pourra observer par imagerie. L'évolution de l'infection bactérienne sera alors connue ; la quantité de lumière émise étant proportionnelle au nombre de bactéries dans l'organisme. La Figure 1.4 montre le principe de cette approche. Cette modalité a été aussi mise en œuvre dans l'étude de la réponse immune (Hardy et al. '01; Doyle et al. '04; Roda et al. '04; Zinn et al. '08).

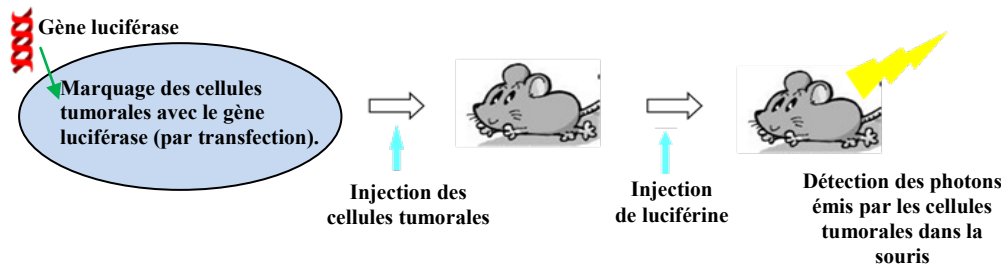


**Figure 1.4 : Principe de mise en œuvre de la bioluminescence pour l'infectiologie.**

Pour l'étude des mécanismes du cancer, des cellules cancéreuses génétiquement modifiées exprimant la luciférase sont inoculées à des souris. La prolifération de ces cellules cancéreuses chez un animal génère alors une tumeur qui produira une quantité de lumière proportionnelle au nombre de cellules présentes (formant la tumeur) lors de l'injection de luciférine. La bioluminescence permet ensuite de suivre l'évolution de la croissance tumorale ou le développement de métastases (Contag et al. '00; Edinger et al. '02; Chia-Chi et al. '07). Elle permet donc la caractérisation de modèles tumoraux chez la souris par la détection précoce du développement tumoral primaire et le suivi longitudinal des métastases. Elle est mise en œuvre par un procédé dénommé transfection<sup>3</sup>. Elle est également exploitée dans l'étude de l'effet d'un agent thérapeutique (réponse à un traitement) sur l'évolution tumorale (Rehemtulla et al. '00; Greer et Szalay '02 ; Massoud et Gambhir '03; Paroo et al. '04; Roda et

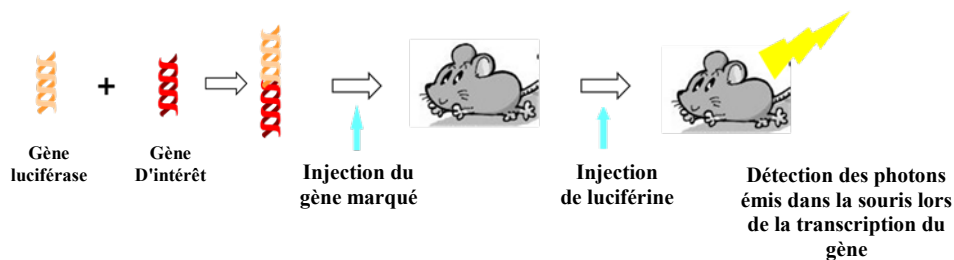
<sup>3</sup> On appelle transfection le processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes (avec noyau), non-médié par un virus, par opposition à la transduction. (Source : Introduction à l'analyse génétique Par Anthony J. F. Griffiths, David T. Suzuki, Chrystelle Sanlaville).

al. '04; Rettig et al. '06; Chia-Chi et al. '07; Zinn et al. '08), elle offre donc un procédé de choix pour l'évaluation de nouvelles molécules à visées thérapeutiques anticancéreuses. Le principe pour la cancérologie est représenté schématiquement en Figure 1.5.



**Figure 1.5 : Principe de mise en œuvre de la bioluminescence pour la cancérologie.**

La bioluminescence permet aussi l'évaluation ou l'analyse de l'activité de promoteurs dans le processus d'expression de gènes ou de protéines (Contag et Bachmann '02; Roda et al. '04; Rettig et al. '06). C'est-à-dire que l'on peut marquer directement un gène comme le montre la Figure 1.6. Ce gène, induit la transcription du gène de la luciférase. Le suivi de la réaction de bioluminescence permet de connaître le degré de transcription du gène d'intérêt. L'introduction du gène marqué à la souris peut se faire par un processus viral ou bactérien.



**Figure 1.6 : Principe de mise en œuvre de la bioluminescence pour la thérapie génique.**

Pour les trois exemples cités ci-dessus, la démarche générale pour réaliser de l'imagerie de bioluminescence *in vivo* non invasive reste la même. Seul change, selon l'application visée, les conditions d'intégration du gène rapporteur de la luciférase. Les cellules, bactéries ou vecteurs marqués avec ce gène sont injectés à l'animal par voie intraveineuse ou en sous-cutanée. Au moment de la réalisation de l'imagerie, on procède à l'injection du substrat luciférine par voie intra péritonéale<sup>4</sup>. En présence d'oxygène et d'ATP, la bioluminescence apparaît sans qu'aucune excitation extérieure ne soit nécessaire. Seules les

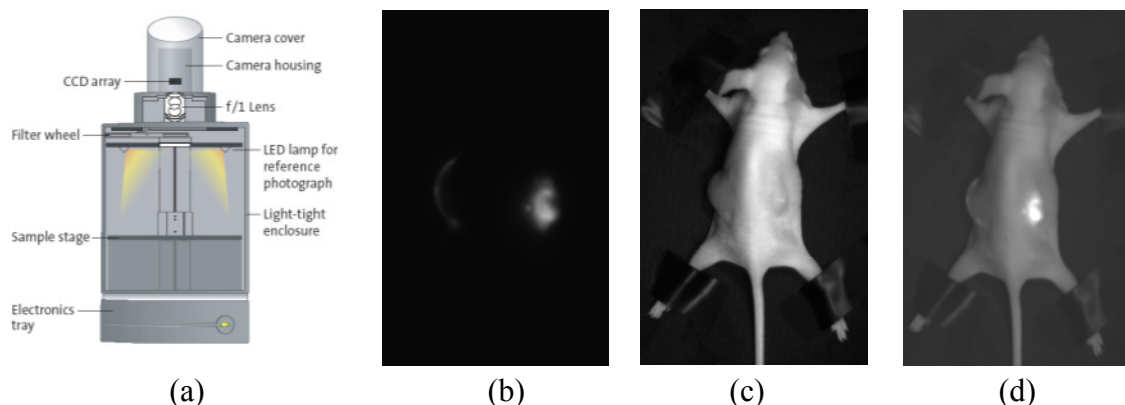
<sup>4</sup> Le péritoine est une fine membrane, appelée séreuse, qui tapisse la cavité abdominale et l'extérieur des viscères contenus par cette cavité. (Source : Atlas d'anatomie humaine 4ème édition de Frank-H Netter, Pierre Kamina (Traducteur) édition Masson).

cellules ou entités génétiquement modifiées exprimant la luciférase produiront un signal lumineux proportionnel à la quantité de ces cellules ou entités.

Pour l'acquisition de l'image de bioluminescence, l'animal est anesthésié après injection de la luciférine et le signal bioluminescent est acquis à l'aide d'une caméra CCD comme exposé ci-après.

### 1.3.1 Système d'acquisition du signal de bioluminescence

Un dispositif d'acquisition d'imagerie de bioluminescence se compose d'une chambre noire hermétique équipée d'une caméra CCD haute sensibilité. Lors de l'acquisition, afin de réduire le bruit de fond, le sujet à imager est mis dans la chambre noire empêchant ainsi toute lumière extérieure de pénétrer. En général, le signal généré par les sources bioluminescentes est faible nécessitant des caméras d'une haute efficacité quantique pour la détection d'un nombre très faible de photons. De plus, les éléments CCD sont refroidis (autour de  $-100^{\circ}\text{C}$ ) pour réduire au maximum le bruit électronique. En ce sens, la sensibilité de l'imagerie bioluminescente a été significativement améliorée par le progrès technologique des caméras CCD. Cette caméra est reliée à une unité de traitement munie d'un logiciel dédié qui restitue le signal acquis sous forme d'image (Figure 1.7 (b)). Le système permet également de prendre un cliché du sujet imagé en lumière visible grâce aux leds placées dans la chambre avant acquisition du signal de bioluminescence proprement dit, pour permettre par la suite une superposition des données acquises avec l'image en visible (voir Figure 1.7 (d)).



**Figure 1.7 : (a) Principe du système d'acquisition en imagerie de bioluminescence, (b) Exemple d'acquisition de bioluminescence, (c) Image de la souris acquise avec éclairage, (d) Fusion de l'image de bioluminescence et de l'image acquise lorsque la souris est éclairée.**



**Figure 1.8 : Système utilisé pour l'acquisition des images de bioluminescence (Hamamatsu Macroscopic Imaging AEQUORIA system).**

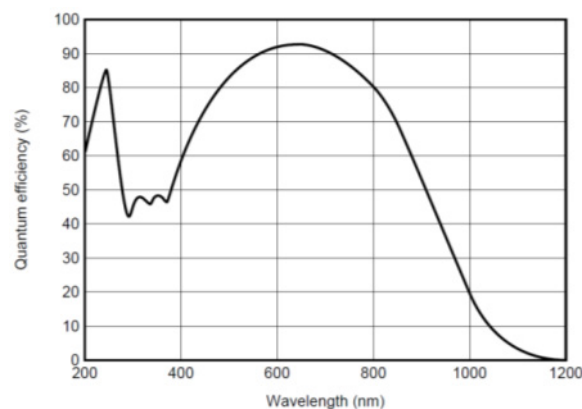
### **1.3.2 La caméra CCD**

Les détecteurs employés en imagerie de bioluminescence sont des dispositifs à transferts de charge (CCD), car ils présentent une grande efficacité quantique ( $\geq 85\%$ ). Un CCD se présente sous forme d'une matrice à deux dimensions de détecteurs photosensibles qui correspondent aux pixels. Le nombre de pixels définit la résolution pour une optique donnée. Lorsque les pixels (photosites) reçoivent les photons émis par la réaction de bioluminescence, ils produisent des électrons (charges), ces charges s'accumulent dans les photosites, leur nombre est proportionnel à la quantité de lumière reçue. Il est à noter que lorsqu'un photosite reçoit un trop grand nombre de photons, il sature (atteint sa capacité maximale de stockage). A la fin de l'acquisition, la matrice est lue. Pour ce faire, les charges accumulées dans les photosites sont amenées en séquence vers la broche de sortie du CCD, où le courant de sortie est mesuré. Cette opération vide progressivement tous les photosites de leurs charges, et les réinitialise pour l'acquisition suivante. Pour lire la matrice (l'image), il faut récupérer les valeurs des charges (électrons) contenues dans chacun des photosites. Pour cela, la matrice CCD est associée à une électronique, qui génère des signaux de lecture, appelés horloges. Les charges électriques récupérées sur la broche de sortie de chaque photosite sont amplifiées puis passent dans un convertisseur analogique numérique pour être converties en valeurs numériques codées soit en 8, 12, 14 ou 16 bits. Ces valeurs pourront être lues par un ordinateur et restituées sous forme d'image.

Lors d'une acquisition, en plus des charges dues aux photons émis par la bioluminescence, d'autres charges supplémentaires (charges thermiques) s'accumulent spontanément même en l'absence de lumière ; elles sont dues en grande partie aux variations thermiques de l'électronique d'instrumentation. Avant de lancer une nouvelle acquisition, on lit la matrice une ou plusieurs fois pour vider ces charges thermiques. Cette lecture est rapide car on ne mesure pas le courant de sortie.

### 1.3.3 Caractéristiques électroniques des caméras CCD

La **sensibilité** du CCD est couramment exprimée en électron produit par photon incident. Cette quantité s'appelle rendement quantique équivalent (RQE, en anglais « quantum efficiency »). Elle atteint des valeurs  $\geq 85\%$  pour les CCD. Cette sensibilité varie avec la longueur d'onde. Le maximum de sensibilité est situé vers 0,6-0,7  $\mu\text{m}$  (dans le rouge). Cette sensibilité aux longueurs d'ondes des caméras CCD peut être étendue à d'autres longueurs d'onde par l'ajout d'une couche fluorescente dans le capteur et l'utilisation d'un capteur CCD aminci et rétroéclairé. C'est le cas du capteur utilisé dans la caméra CCD ORCA<sub>II</sub> BT 512 de HAMAMATSU, dont le spectre de sensibilité est représenté Figure 1.9.



**Figure 1.9 : Spectre de sensibilité de la caméra CCD (ORCA2 BT 512 HAMAMATSU<sup>®</sup>) munie du capteur C4742-98-26LA.**

La **capacité des pixels**, ou profondeur des puits, est le nombre de charges que peut contenir un photosite. Elle est liée à la taille des pixels, et varie de 50 000 à 1 000 000 électrons selon les modèles. La dynamique est le rapport entre la capacité et le nombre d'électrons générés de façon aléatoire (le bruit) ; on obtient couramment des dynamiques de l'ordre de 10 000 avec les CCD.

**La linéarité** des CCD est très bonne : le nombre de charges produites est presque exactement proportionnel au flux reçu, même pour des flux faibles et des temps de pose courts. Ceci permet l'addition d'images pour les objets dont le flux lumineux est faible et la mesure photométrique directe sur les images.

**L'efficacité de transfert** est de l'ordre de 0,99999, ce qui signifie que 1 électron sur 100 000 sera perdu au cours du transfert et pourra contaminer les pixels suivants durant la lecture. Le bruit ainsi généré est plus important pour les pixels lus en derniers, c'est à dire pour les lignes situées en haut de l'image.

**Le courant d'obscurité** est pour l'essentiel dû aux charges générées spontanément lorsque la matrice n'est pas éclairée (charges thermiques). Pour un pixel donné, il est proportionnel au temps de pose et ne dépend que de la température. Ce courant doit être limité le plus possible d'une part pour éviter la saturation intempestive des photosites, d'autre part pour réduire le bruit associé. On le limite très efficacement en refroidissant le CCD à des températures de l'ordre de  $-100^{\circ}\text{C}$  (circulation d'azote liquide), ou avec des dispositifs électriques (modules Peltier). Le nombre d'électrons thermiques générés par seconde est typiquement de l'ordre de 1 à 100 à  $20^{\circ}\text{C}$  ; ce nombre est réduit d'un facteur 2 chaque fois qu'on refroidit de  $6^{\circ}\text{C}$ .

**Le binning** consiste à additionner les charges de plusieurs photosites (pixels) avant conversion numérique, ainsi si on fait un binning de 2, cela signifie que l'on regroupe quatre pixels pour ne faire qu'un seul pixel. Un binning de 3 correspond au regroupement de 9 pixels en un. Le binning permet d'augmenter la sensibilité mais cela au détriment de la résolution.

#### 1.3.4 Limitations de la bioluminescence

La bioluminescence bien que très utilisée en imagerie moléculaire, présente plusieurs limites qui peuvent faire que la quantité de lumière détectée ne soit pas la représentation fidèle du phénomène observé. Les limites de l'imagerie de bioluminescence (Rice et al. '01) sont liées d'une part au principe même de cette modalité, c'est-à-dire aux limitations biologiques d'une part et d'autre part aux problèmes de la propagation du flux lumineux dans les tissus.

**Limitations biologiques** : la réaction de bioluminescence fait appel à plusieurs molécules telles que l'ATP, l' $\text{O}_2$  ou la luciférine. Si une de ces molécules est en quantité insuffisante, l'émission lumineuse n'est pas représentative de l'activité de la luciférase. Cette technique d'étude de l'expression génique est dépendante du métabolisme. En effet, pour que la réaction de bioluminescence ait lieu, la présence d'oxygène et d'ATP est nécessaire.



Lorsque les tumeurs grossissent, très rapidement leur zone centrale devient hypoxique (pas irriguée par le sang) ce qui ne perturbe pas leur croissance puisque les cellules tumorales peuvent passer d'un métabolisme aérobie (utilisant de l'O<sub>2</sub>) à un métabolisme anaérobie<sup>5</sup> (absence de l'O<sub>2</sub>). Dans ce cas, les cellules n'utilisent plus d'oxygène et la synthèse d'ATP est très faible donc l'émission de bioluminescence est réduite. Un problème peut alors se poser dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité d'un traitement, car si la bioluminescence diminue, on peut se demander si c'est parce que le traitement est efficace et que la tumeur a régressé, ou bien si c'est parce que la tumeur a grossi et possède un métabolisme anaérobie.

La luciférine peut être cytotoxique, elle doit donc être utilisée à faible dose, et l'examen de bioluminescence est contre indiqué immédiatement après l'induction tumorale car il y a un risque que l'injection de luciférine ralentisse la prolifération des cellules tumorales.

**Limitations physiques :** Elles sont dues à l'absorption et la diffusion du signal lumineux dans les tissus. L'intensité des photons détectés est plus faible que l'intensité des photons émis. Ainsi un foyer tumoral situé près de la surface va apparaître plus brillant qu'un foyer équivalent situé plus en profondeur. De manière générale, l'intensité des photons diminue d'un facteur 10 par cm de tissus traversé. Enfin, à cause de la diffusion des photons dans les tissus, les foyers tumoraux apparaissent plus étendus qu'ils ne le sont en réalité ce qui ne permet pas de localiser leurs contours réels.

## 1.4 Conclusion

L'imagerie optique par bioluminescence est une modalité assez récente comparée aux modalités classiques. Elle connaît un succès grandissant dans la communauté scientifique du fait de son faible coût, de sa facilité de mise en œuvre (elle ne nécessite pas d'opérateur dédié) et de sa grande sensibilité. Elle permet un suivi longitudinal sur le même animal car elle est quasi non invasive ; le substrat s'élimine dans les tissus de l'animal au bout de quelques heures et une autre observation peut être faite. Ce qui n'est pas possible avec certaines autres modalités comme par exemple pour la radiographie X où plusieurs acquisitions successives ne peuvent être faites pour des raisons de surdosage pour l'animal.

L'imagerie par bioluminescence présente néanmoins quelques inconvénients. Comme le signal est faible, les caméras utilisées sont très sensibles pour capter le maximum de signal,

---

<sup>5</sup> On appelle **milieu anaérobie** un milieu où il n'y a pas présence de dioxygène (O<sub>2</sub>). (Source : <http://www.techno-science.net>).

cette grande sensibilité fait que la caméra est aussi sensible aux bruits d'instrumentation. Un autre inconvénient lié à cette modalité sont les effets de diffusion et d'absorption des tissus traversés par le signal ; l'image captée par le système n'est pas le reflet fidèle de la source émettrice.

## 2 Modélisation des images de bioluminescence

***Résumé :** La première partie de ce chapitre est consacrée à la modélisation de la formation des images de bioluminescence. Ainsi, nous allons voir le principe physique qui régit la formation de ces images et les différents bruits liés au processus d'acquisition. Après l'étude des différents bruits, on montre que l'on est en présence d'un processus de Poisson. Ceci est dû au principe d'acquisition lui-même ; on est en présence d'un faible flux de photons capté par la caméra CCD. De plus, un bruit blanc Gaussien et un bruit impulsionnel perturbent l'acquisition. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la chaîne de traitement proposée pour les images de bioluminescence. Cette modélisation a pour but de mettre au point la restauration des images notamment pour la suppression du bruit impulsionnel et pour une meilleure localisation et quantification des sources bioluminescentes.*

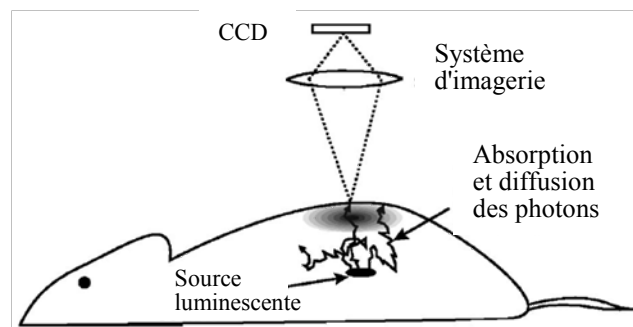
### 2.1 Introduction

L'imagerie de bioluminescence est une imagerie 2D dont les sources lumineuses sont internes à l'animal. Cette technique présente néanmoins deux difficultés principales : l'absorption et la diffusion dans les tissus. En traversant les tissus, une partie de la lumière émise va être absorbée et donc ne va pas être détectée par la caméra. De même, la pigmentation de la peau est également une source d'absorption. La lumière va subir des effets de diffusion et d'absorption. Ceci est dû au changement des indices de réfraction au passage dans différents milieux. La combinaison de ces deux phénomènes font que moins de 10% de la lumière émise par le foyer luminescent sort effectivement de la souris, d'où la nécessité d'utiliser des caméras ultrasensibles à bas bruit et de s'intéresser aux techniques de traitement d'images pour localiser et quantifier le plus précisément possible les sources lumineuses.

Suite aux diverses constatations sur le principe d'acquisition, il est proposé dans ce chapitre un modèle de formation de ces images.

## 2.2 Formation des images de bioluminescence

La formation des images de bioluminescence résulte du comptage de photons émis par une source rayonnant dans toutes les directions à partir de l'intérieur du petit animal et pouvant être captée à l'extérieur par une caméra CCD. Les sources lumineuses sont de faible intensité et les signaux émis subissent des phénomènes de diffusion et d'absorption dans les tissus traversés (voir Figure 2.1).



**Figure 2.1: Illustration de la diffusion et l'absorption du signal lumineux dans les tissus.**

Lors de l'acquisition, la caméra CCD est refroidie pour être très sensible au phénomène observé. Cette sensibilité a pour inconvénient qu'une acquisition, même en l'absence de toutes sources lumineuses, produit une image présentant un bruit aléatoire (Rice et al. '01). Ce bruit est la somme du bruit de lecture, du bruit de quantification et du bruit lié au courant d'obscurité. A ces différents bruits s'ajoutent un bruit d'instrumentation et un bruit supplémentaire qui est attribué au rayonnement cosmique (Florentin-Nielsen et al. '95; Groom '02). Pour minimiser ces phénomènes, la réalisation du système d'acquisition fait l'objet de tous les soins des constructeurs (refroidissement de la caméra, boîtier hermétique pour l'acquisition, ..., etc).

### 2.2.1 Les différents bruits liés à l'acquisition des images de bioluminescence

Le signal de bioluminescence acquis par la caméra CCD est entaché de bruits divers. Ces différents bruits sont décrits ci-après.

**Le bruit de lecture** (read-out noise) est dû d'une part à l'efficacité du transfert de charges, d'autre part à la précision de l'amplification analogique. Ces deux quantités diminuent quand la vitesse de lecture du CCD augmente. Les CCD présentent typiquement un bruit de lecture compris entre 10 et 100 électrons par pixel. A noter que le bruit de lecture intervient une fois lors de chaque mesure, de façon indépendante. Pour cette raison, la somme de plusieurs images n'est pas équivalente à une seule pose ayant une durée totale égale à la somme des poses élémentaires.

**Le bruit thermique** est lié au courant d'obscurité. Il est dû pour l'essentiel à l'incertitude sur le nombre d'électrons générés spontanément durant la pose et la lecture. Ce bruit dépend fortement de la température, et varie proportionnellement au temps de pose pour une température donnée. Donc, pour réduire ce bruit, il faut réduire le nombre d'électrons thermiques, en refroidissant le CCD.

**Les parasites** sont une autre source d'incertitude, qui dépend de l'environnement électromagnétique dans lequel est effectué l'acquisition, et du blindage du CCD. Ils se traduisent le plus souvent par des pixels de haute intensité de niveaux de gris sur l'image. Les rayons cosmiques sont l'une des causes de ce parasitage.

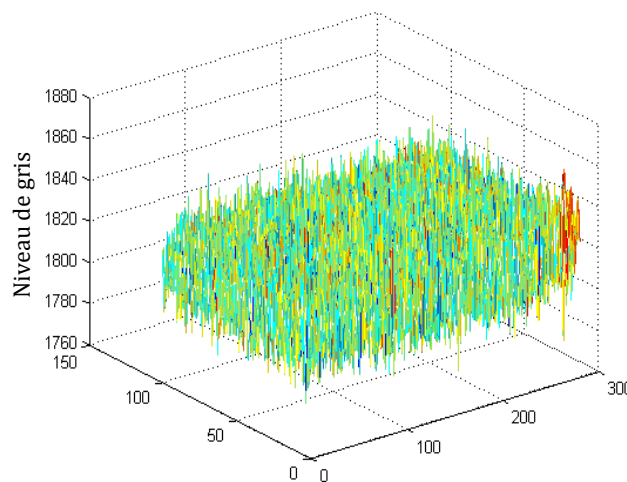
**Le bruit de numérisation** est l'erreur moyenne commise en échantillonnant le signal analogique sur un nombre fini d'états de quantification. On a donc intérêt à coder le signal analogique sur un grand nombre d'états. Dans notre cas, les niveaux de gris sont codés sur 16 bits, c'est-à-dire sur 65535 valeurs. Le Rapport Signal à Bruit (RSB) est égal à  $10,8 + 6 N$  (dB) avec N le nombre de bits (Max et Lacoume '04).

La variance du bruit est la somme des variances des différents bruits entachant le signal, car ceux-ci sont indépendants. Elle s'écrit :

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \sigma_{\text{lecture}}^2 + \sigma_{\text{thermique}}^2 + \sigma_{\text{parasites}}^2 + \sigma_{\text{numérisation}}^2$$

## 2.2.2 Nature des bruits liés à l'acquisition des images de bioluminescence

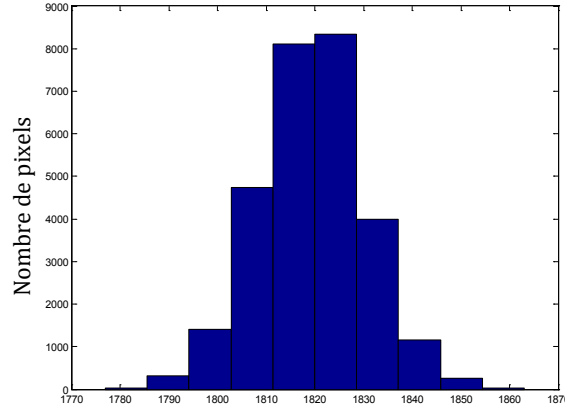
Pour connaître la nature du bruit présent lors de l'acquisition de nos images de bioluminescence dont un exemple est présenté en Figure 2.2, nous allons utiliser des tests d'hypothèse. Ces tests permettront de définir si ce bruit suit une loi normale (gaussien), s'il est stationnaire et/ou s'il est blanc. Un test d'hypothèse consiste à formuler une hypothèse de base ou hypothèse nulle  $H_0$ . Toute autre hypothèse différente est désignée par hypothèse alternative et est notée  $H_1$ . Sur la base de supposition qu'une hypothèse donnée est vraie, nous devons trouver des valeurs d'indicateurs mesurées sur le bruit proches de celles espérées théoriquement. Dans ce cas, l'hypothèse  $H_0$  est acceptée sinon l'hypothèse  $H_0$  est rejetée et on acceptera  $H_1$ .



**Figure 2.2: Exemple d'image de bioluminescence en 3D d'une zone où il n'y a que du bruit présent.**

### 2.2.2.1 Test de Normalité

Dans la plupart des problèmes statistiques, la distribution d'un échantillonnage est inconnue. Pour voir si la distribution de cet échantillonnage suit une distribution spécifique, nous avons recours au test du chi-deux (Mann et Wald '42) ou à celui de Kolmogorov-Smirnoff. Dans notre test de normalité, nous allons utiliser le test du chi-deux. Pour connaître la densité de probabilité (*ddp*) du bruit, l'histogramme de la réalisation (bruit de l'image) est calculé en considérant que cette réalisation est composée de  $L$  classes. A titre d'exemple, sur la Figure 2.3, nous avons tracé l'histogramme d'une zone sélectionnée sur une image de bioluminescence. Cette zone ne contient que du bruit. On constate visuellement que la distribution des intensités des niveaux de gris du bruit présente une forme gaussienne.



**Figure 2.3: Représentation sous forme d'histogramme des intensités des niveaux de gris d'une zone ne contenant que du bruit d'une image de bioluminescence.**

Pour ce test d'hypothèse,  $H_0$  l'hypothèse nulle est telle que la *ddp* du bruit suit une loi normale et  $H_1$  est l'hypothèse complémentaire :

$$\begin{cases} H_0 : \text{le processus suit une loi normale,} \\ H_1 : \text{le processus ne suit pas une loi normale.} \end{cases} \quad (2.1)$$

Pour cette vérification, on est amené à comparer les réalisations théoriques avec les réalisations mesurées.

Soit un échantillon  $E$  composé de  $N$  valeurs :  $E = \{e_0, e_1, \dots, e_{N-1}\}$  et  $X_i$  son histogramme formé de  $L$  classes de valeurs  $1 \leq i \leq L$ . On forme alors la statistique suivante notée  $\chi^2$ , homogène à une distance normalisée comme suit :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^L \frac{(X_i - Np_i)^2}{Np_i}, \quad (2.2)$$

où  $Np_i$  est le nombre de réalisations théoriques. Dans le cas  $\chi^2 = 0$ , il y a accord parfait entre la théorie et la réalisation. Plus la valeur  $\chi^2$  est grande, plus il y a de différence entre les deux.

Selon la taille de l'échantillon  $N$  considéré, on choisit le nombre de classes  $L$  qui sera le nombre de sous régions de la distribution. La distribution est ensuite coupée en  $L$  classes de manière équiprobable et on forme la statistique  $\chi^2$  qui est une variable qui suit une loi du chi-deux à  $L-3$  ddl (degrés de libertés). En effet, le calcul de la moyenne et de la variance enlève deux ddl. Puis, on se fixe un niveau de signification  $\alpha$  (par exemple 1%) et si  $\chi^2$  (valeur du khi-deux obtenue pour l'échantillon considéré) est inférieur à  $\chi^2_\alpha$  (valeur du khi-deux lue sur

la table de la loi du khi-deux pour le nombre de *ddl* de l'échantillon et le degré de signification  $\alpha$  choisi) alors  $H_0$  est acceptée.

Pour mettre en œuvre ce test, nous avons donc prélevé des échantillons sur des zones d'images de bioluminescence où il n'y a que du bruit (bruit de fond composé du bruit de lecture, bruit thermique et du bruit de numérisation). Ces échantillons sont de taille  $N = 200$  pixels. Pour un échantillon  $E = \{e_0, e_1, \dots, e_{N-1}\}$ , il est procédé comme suit pour tester la normalité au niveau  $\alpha$  et ceci à partir d'intervalles à probabilités égales :

1. On estime la moyenne  $\hat{\mu}$  et l'écart type  $\hat{\sigma}$  de l'échantillon :

$$\hat{\mu} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} e_i, \quad \hat{\sigma} = \left[ \frac{1}{N-1} \sum_{i=0}^{N-1} (e_i - \hat{\mu})^2 \right]^{1/2}$$

2. On choisit le nombre  $L$  de classes (intervalles) dans la table suivante issue du livre de Bendat et Piersol (Bendat et Piersol '71) :

N	200	400	600	800	1000	1500	2000
L	16	20	24	27	30	35	39

Pour nos échantillons à  $N=200$ , nous prendrons donc  $L=16$ .

3. Les bornes de chaque intervalle sont alors obtenues comme suit :
  - a. Les valeurs des bornes normalisées  $a_i$  sont équiréparties entre 0 et 1 :  $a_i = i / L$ .
  - b. Les valeurs correspondantes des variables aléatoires réduites  $x_i$  sont lues dans la table de la loi normale au pourcentage  $\alpha$ .
  - c. Les valeurs correspondantes des bornes  $\{s_i\}$ ,  $0 \leq i \leq L-1$ , sont déduites des  $x_i$  par changement de variable :  $s_i = \hat{\sigma} x_i + \hat{\mu}$ .

Le nombre d'échantillons  $X_i$  dans chaque intervalle est ensuite mesuré.

4. Pour chaque intervalle, nous calculons la grandeur  $\frac{(X_i - Np_i)^2}{Np_i}$ , où  $Np_i = \frac{N}{L} \quad \forall i$ .
5. La somme des grandeurs calculées forme la statistique  $\chi^2$ . Cette somme est ensuite comparée avec la valeur  $\chi^2_\alpha$  lue dans la table de la loi du khi-deux à  $L-3$  ddl.
6. Si  $\chi^2 < \chi^2_\alpha$ , l'hypothèse de normalité est acceptée au niveau  $\alpha$ .

Les valeurs obtenues sur l'échantillon considéré sont pour la moyenne estimée  $\hat{\mu}=1819$  et pour l'écart type estimé  $\hat{\sigma} = 10,949$ . On construit l'histogramme avec 16 intervalles de probabilités égales ( $Np_i = N/L = 12,5$ ) et on détermine les bornes de ces intervalles d'abord en variable aléatoire réduite  $x_i$  (3<sup>ième</sup> colonne du tableau 2.1) puis en amplitude  $S_i$  (4<sup>ième</sup> colonne).



**Tableau 2.1 : Résultats obtenus pour un exemple d'échantillon de bruit sélectionné sur une image de bioluminescence.**

Intervalles (L)	$a_i$	$x_i$	$S_i = \hat{\sigma} x_i + \hat{\mu}$	$X_i$	$Np_i$	$ X_i - Np_i $	$ X_i - Np_i ^2 / Np_i$
1	0.9375	-1.53	1803.2	15	12.5	2.5	0.5
2	0.8750	-1.15	1807.3	11	12.5	1.5	0.18
3	0.8125	-0.89	1810.2	8	12.5	4.5	1.62
4	0.7500	-0.67	1812.6	12	12.5	0.5	0.02
5	0.6750	-0.49	1814.5	16	12.5	3.5	0.98
6	0.6125	-0.32	1816.4	13	12.5	0.5	0.02
7	0.5625	-0.16	1818.1	12	12.5	0.5	0.02
8	0.5000	0	1819.9	8	12.5	4.5	1.62
9	0.4375	0.16	1821.7	12	12.5	0.5	0.02
10	0.3750	0.32	1823.4	15	12.5	2.5	0.50
11	0.3125	0.49	1825.3	15	12.5	2.5	0.50
12	0.2500	0.67	1827.2	13	12.5	0.5	0.02
13	0.1875	0.89	1829.6	11	12.5	1.5	0.18
14	0.1250	1.15	1832.5	13	12.5	0.5	0.02
15	0.0625	1.53	1836.6	15	12.5	2.5	0.50
16	0			11	12.5	1.5	0.18

Le nombre de ddl est égal à  $16 - 3 = 13$ . On obtient  $\chi^2 = 6.88$ .

$\chi^2_\alpha$  est égale à 22,4 (valeur lue dans la table de la loi normale) pour un niveau de signification  $\alpha=1\%$  et 13 ddl. Comme  $\chi^2 < \chi^2_\alpha$ , l'hypothèse  $H_0$  d'un processus gaussien est acceptée. Ce test a été mené sur 100 échantillons de taille  $N=200$  prélevés sur différentes zones et sur différentes images de bioluminescence. Les résultats obtenus sur ses différents échantillons donnent des valeurs de  $\chi^2 < \chi^2_\alpha$  ce qui confirme notre hypothèse sur le fait que le bruit est Gaussien. Ce résultat a été confirmé par le test de Kolmogorov-Smirnoff.

### 2.2.2.2 Test de blancheur

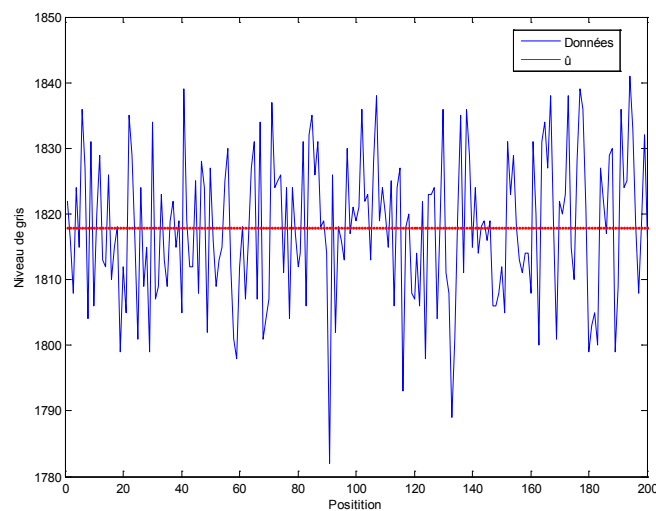
Pour ce test,  $H_0$  est telle que si un signal est blanc alors ses échantillons doivent être distribués avec une équiprobabilité autour de la moyenne estimée  $\hat{\mu}$ . Cette moyenne estimée est calculée comme précédemment (étape 1 du test de normalité). Pour valider cette hypothèse, il est procédé à un Run-test dont le principe consiste à compter le nombre de segments (SEG) dont les échantillons successifs sont en totalité supérieurs ou inférieurs à  $\hat{\mu}$ . Puis nous testons si ce nombre est compris dans l'intervalle donné dans la table de la loi du Run.

Avec cette distribution équiprobable, SEG est une variable aléatoire du Run (Bendat et Piersol '71) de moyenne  $\frac{N}{2} + 1$  et de variance  $\frac{N(N-2)}{4(N-1)}$ .

On peut donc construire un test d'hypothèse.

$$\begin{cases} H_0 : \text{le processus est blanc,} \\ H_1 : \text{le processus n'est pas blanc.} \end{cases} \quad (2.3)$$

L'exemple Figure 2.4 présente une séquence de données (200 pixels) prélevée sur une zone d'image de bioluminescence ne contenant que du bruit. La ligne rouge représente la moyenne estimée obtenue pour cette séquence.



**Figure 2.4: Exemple d'échantillon de niveaux de gris de bruit prélevé dans une zone ne contenant que du bruit sur une image de bioluminescence.**

Pour cette séquence, nous avons obtenu un nombre total de Runs égal à 104 et dans la table de la loi du Run, nous lisons un intervalle compris entre 84 et 117. Donc l'hypothèse d'indépendance est vérifiée car le nombre de Run est compris dans cet intervalle. Nous avons mené le même test sur un ensemble d'échantillons prélevé sur différentes images et différentes zones de ses images. Le nombre de Runs obtenu est compris entre 87 et 117. Ce résultat montre que le bruit présent sur les images de bioluminescence est blanc.

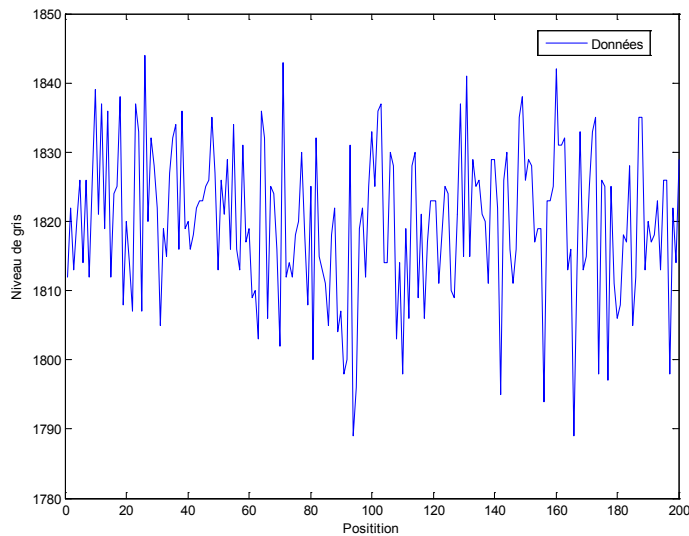
### 2.2.2.3 Test de stationnarité

Généralement, on teste uniquement si un processus est stationnaire soit pour la moyenne, soit pour la variance, soit pour la moyenne quadratique. Le principe est le suivant.

L'échantillon initial de  $N$  valeurs est segmenté en  $Q$  segments égaux et jointifs. Un test d'hypothèse pour savoir si le bruit est stationnaire ou pas est mené :

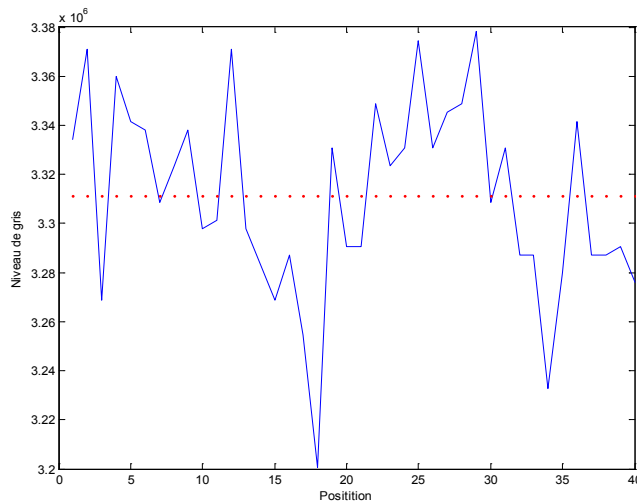
$$\begin{cases} H_0 : \text{le processus est stationnaire,} \\ H_1 : \text{le processus n'est pas stationnaire.} \end{cases} \quad (2.4)$$

Afin de vérifier l'hypothèse  $H_0$  nous allons utiliser le Run test. Le signal de 200 valeurs de niveaux de gris tel que reporté Figure 2.5 est scindé en  $Q$  segments de longueur  $S$ .



**Figure 2.5: Exemple d'échantillon de bruit prélevé dans une zone ne contenant que du bruit sur une image de bioluminescence.**

Une fois les segments formés, il est calculé pour chacun d'eux la valeur  $M_Q = \hat{\mu}_Q^2 + \hat{\sigma}_Q^2$ . Ainsi, une nouvelle séquence de  $Q$  valeurs est formée sur laquelle est appliqué le Run test. Pour nos échantillons de données, nous avons choisi une taille de segment de 5. Cela nous donne un nouvel échantillon formé de 40 segments. Les résultats obtenus sur cet échantillon (Figure 2.5) avec une taille de segment de 5 sont reportés sur la Figure 2.6.



**Figure 2.6: Echantillon précédent scindé en Q segments de taille 5.**

L'intervalle d'acceptation issu de la table de la loi du Run est compris entre 13 et 28. Sur cette séquence, nous avons obtenu un total de 19 Runs. Ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse  $H_0$  selon laquelle le bruit présent dans cette image est stationnaire. Nous avons obtenu des résultats quasi-similaires pour tous les échantillons testés. Ce qui confirme que le bruit présent dans les images de bioluminescence est stationnaire.

#### **2.2.2.4 Conclusion**

Nous avons mené différents tests sur des zones d'images de bioluminescence dans lesquelles n'était présent que le bruit excepté le bruit lié aux parasites (dus aux rayons cosmiques). A partir des différents tests (normalité, stationnarité et blancheur), nous pouvons affirmer que l'ensemble des bruits peut être considéré comme un bruit blanc gaussien stationnaire qui s'ajoute au signal dû aux sources de bioluminescence. Nous sommes maintenant en mesure de proposer un modèle de formation des images de bioluminescence.

### **2.3 Le modèle de formation des images de bioluminescence**

La source émet des photons dans toutes les directions et seule une petite partie de ces photons va atteindre la caméra. De par le faible nombre de photons reçus, le principe d'acquisition de ce type d'imagerie s'apparente à celui rencontré en imagerie de médecine nucléaire (Charalambous et al. '91), en imagerie astronomique (Starck et al. '02) ou encore en microscopie optique (Sarder et Nehorai '06). De récents travaux sur ces modalités d'imagerie donnent des synthèses des modèles utilisés (Lantéri et al. '02; Starck et al. '02; Sarder et

Nehorai '06). Le modèle adopté est celui de Poisson, qui rend compte de la formation de l'image auquel s'ajoute un terme représentant les différents bruits.

Pour chaque pixel du CCD, nous faisons l'hypothèse que le signal de sortie est une fonction linéaire du flux reçu. Le modèle que nous proposons pour l'imagerie de bioluminescence peut être exprimé comme :

$$I(x, y) = P([o(x, y) * h(x, y)]) + b(x, y), \quad (2.5)$$

avec  $I$  : intensité de l'image acquise,

$O$  : l'image source,

$h$  : la réponse impulsionnelle du système ou PSF (pour : Point Spread Function),

$*$  : un produit de convolution,

$P$  : le processus Poissonien,

$b$  : un bruit additionnel composé d'un bruit blanc gaussien stationnaire (BBGS) et d'un bruit impulsionnel (BI).

## 2.4 Conclusion

Après avoir étudié la formation des images de bioluminescence, nous avons identifié la nature des différents bruits liés à l'acquisition. Puis, en tenant compte du principe physique inhérent à la création d'une image à partir de sources lumineuses, nous avons proposé un modèle de formation pour les images de bioluminescence.

L'objectif est d'exploiter ces images, c'est-à-dire pouvoir localiser et quantifier les sources lumineuses qui sont directement liées à l'activité des cellules étudiées (tumeurs, bactéries, gènes, ...). Il s'agit donc à partir de l'image acquise  $I$  de retrouver l'image  $o$ . Ceci impose deux grandes étapes de traitement d'images qui sont une étape de filtrage pour la suppression du bruit et une de déconvolution pour l'accès à l'image originale. Comme le bruit est additif et comporte deux composantes (BBG et BI), nous proposons dans une première phase d'éliminer le bruit impulsionnel imputé aux cosmiques. Puis, nous nous intéresserons à la phase de déconvolution.

Deuxième partie :

**Mise en oeuvre de la chaîne de traitement  
des images de bioluminescence**

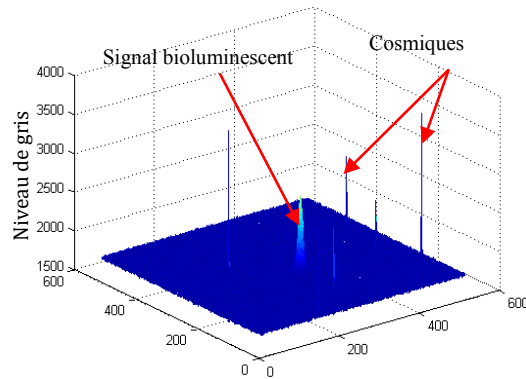
## 3 Filtrage des images de bioluminescence

***Résumé :** Dans ce chapitre, nous présentons un nouveau filtre médian qui va constituer le premier bloc de notre chaîne de traitement. L'étude bibliographique et le test de différentes méthodes de filtrage récemment publiées ont permis de définir et mettre au point un nouveau filtre très performant. Le principe de ce filtre est basé sur le calcul de la moyenne pondérée et de la variance pondérée des niveaux de gris de la fenêtre d'observation considérée. Ce filtre reprend le principe du filtre médian commuté (en anglais SWM : SWitching Median filter) qui est composé de deux étapes : une étape de détection suivie d'une étape de décision pour le pixel central de la fenêtre d'observation. Ce filtre sera utilisé pour filtrer les images de bioluminescence avant l'étape de déconvolution.*

### 3.1 Introduction

Lors de l'acquisition des images de bioluminescence, nous constatons l'apparition de zones très ponctuelles, se manifestant de manière aléatoire et étant de plus ou moins forte intensité. Ce phénomène est essentiellement dû aux rayons cosmiques qui sont des particules très énergétiques provenant de l'espace. La majeure partie de ces rayons sont des protons et des neutrons issus d'explosion de supernovae, de trous noirs, .... Ils pénètrent dans l'atmosphère terrestre à de très grandes vitesses. Ils peuvent aussi provenir de la décroissance de quelques atomes radioactifs présents dans les lentilles qui sont placées juste au dessus du capteur CCD. Ces particules lors de leur collision avec le photosite du capteur CCD génèrent une information parasite (Florentin-Nielsen et al. '95; Groom '02). Cette information prend des valeurs de niveaux de gris aléatoires plus ou moins élevées qui deviennent gênantes

lorsque le signal bioluminescent est faible voire très faible. Sa présence rend la localisation et la quantification du signal utile difficile. Pour donner un ordre d'idée, un exemple d'acquisition d'image de bioluminescence représenté sous forme d'intensités est présenté en Figure 3.1. On peut constater que l'intensité des cosmiques varie de 2000 à 3500 et que le signal de bioluminescence a une intensité maximale de 2500 (niveaux de gris codés sur 16 bits).



**Figure 3.1 : Exemple d'une image de bioluminescence représentée sous forme d'intensité pour la mise en évidence de l'effet des rayons cosmiques.**

Ces cosmiques produisent donc des impulsions aberrantes dans l'image, très localisées et repérables car elles n'ont pas le profil gaussien d'une zone bioluminescente. Ces manifestations du fait de leurs caractéristiques aléatoires et ponctuelles, elles peuvent être considérées comme étant un bruit impulsionnel. Il s'avère donc nécessaire d'enlever ces phénomènes parasites par filtrage. Cette étape constituera la phase de prétraitement.

Dans la suite de ce chapitre, après avoir défini la nature de ce bruit impulsionnel caractérisant l'information parasite due aux cosmiques, nous passons en revue les méthodes de filtrage adaptées à ce type de bruit. Après les avoir testées et comparées, une nouvelle approche est proposée.

### **3.2 Nature du bruit cosmique**

Les deux modèles de bruit les plus communément employés dans la littérature pour décrire un bruit impulsionnel sont le modèle de bruit impulsionnel poivre et sel et le modèle de bruit impulsionnel aléatoire uniformément réparti (Chan et al. '04).



Considérons une image originale non bruitée  $X_{ij}$  avec une dynamique de niveau de gris  $[d_{min}, d_{max}]$ , Les deux modèles de bruit impulsionnel sont décrits ci-après.

### 3.2.1 Le bruit impulsionnel poivre et sel

Le bruit impulsionnel poivre et sel ne peut prendre comme valeurs de niveau de gris que le maximum ou le minimum de la dynamique de l'image et cela de façon aléatoire dans le plan image. Le niveau de gris du pixel localisé en  $(i, j)$  de l'image  $Y$  bruitée s'exprime comme étant :

$$Y_{ij} = \begin{cases} d_{min}, & \text{avec la probabilité } p/2, \\ d_{max}, & \text{avec la probabilité } p/2, \\ X_{ij}, & \text{avec la probabilité } 1 - p, \end{cases} \quad (3.1)$$

où  $p$  est la probabilité d'apparition du bruit impulsionnel poivre et sel.

### 3.2.2 Le bruit impulsionnel aléatoire uniformément réparti

Le bruit impulsionnel aléatoire uniformément réparti peut prendre comme valeurs de niveau de gris toutes les valeurs possibles de la dynamique de l'image. Il est réparti spatialement aussi de manière aléatoire sur l'image. Le niveau de gris du pixel localisé en  $(i, j)$  de l'image  $Y$  bruitée s'écrit comme :

$$Y_{ij} = \begin{cases} d_{ij}, & \text{avec la probabilité } p, \\ X_{ij}, & \text{avec la probabilité } 1 - p, \end{cases} \quad (3.2)$$

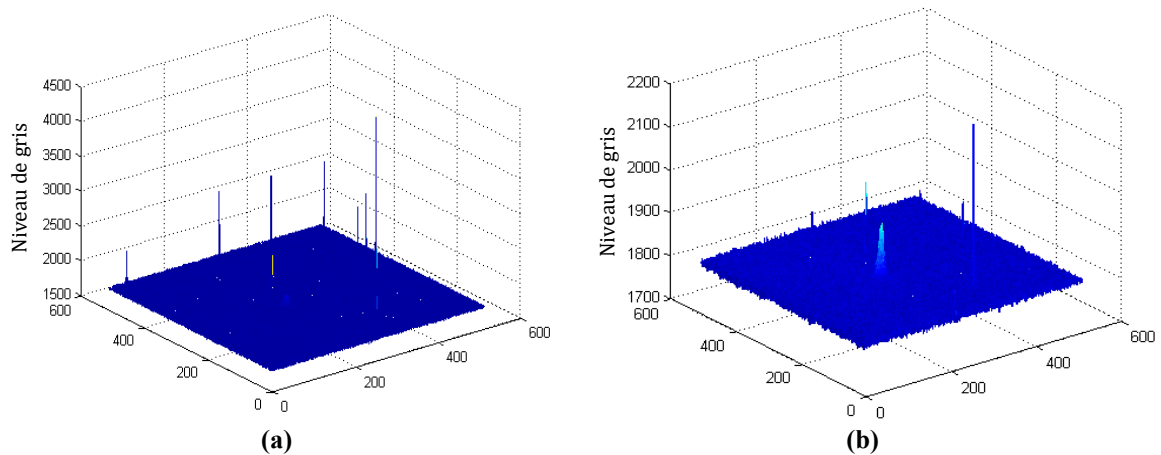
où les  $d_{ij}$  sont des nombres aléatoires compris entre  $[d_{min}, d_{max}]$ .  $p$  est la probabilité d'apparition du bruit aléatoire impulsionnel uniformément réparti.

### 3.2.3 Le bruit cosmique

De par la nature impulsionnelle du bruit cosmique et le fait qu'il peut prendre n'importe quelle valeur de niveau de gris dans la dynamique de l'image acquise (bruit aléatoire), ce bruit peut donc être considéré comme étant un bruit impulsionnel aléatoire. Par la suite, pour tester les filtres nous ne considérerons que le bruit impulsionnel aléatoire uniformément réparti.

Maintenant que nous avons défini la nature du bruit cosmique, il reste à définir une stratégie de filtrage pour éliminer efficacement ce bruit. Ce filtrage doit avoir une incidence minimale ou quasi nulle sur le signal bioluminescent tout en éliminant le bruit cosmique

présent sur les images de bioluminescence acquises. Il est connu et admis que le filtrage médian est le plus adapté à ce type de bruit (Gonzalez et Woods '02). Des essais sur nos images de bioluminescence montrent que le filtre médian standard n'élimine pas complètement les cosmiques comme le montre le résultat de la Figure 3.2. C'est pour cette raison que nous avons recherché une nouvelle approche pour éliminer le bruit impulsionnel.

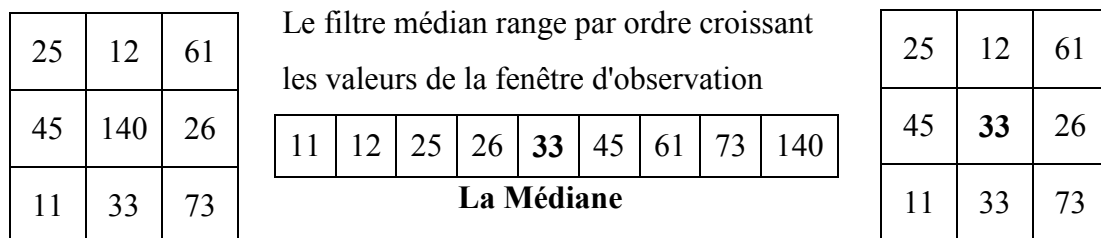


**Figure 3.2 : (a) Image d'une acquisition de bioluminescence entachée de cosmiques, (b) même image après filtrage médian.**

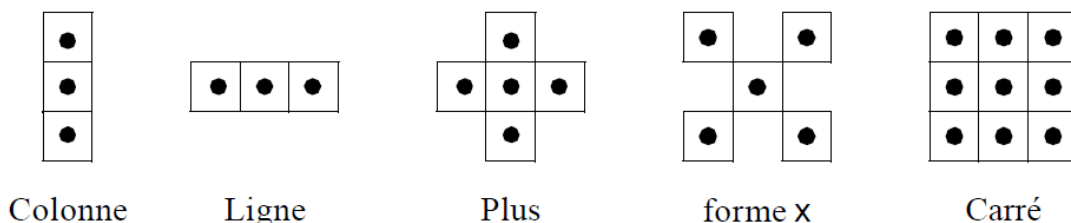
### 3.3 Etat de l'art du filtrage pour le bruit impulsionnel

Le filtrage a pour objectif la réduction des variations d'intensité anormales au sein de chaque région de l'image tout en respectant son intégrité : les transitions et les éléments significatifs au sein de l'image doivent être préservés le plus possible. Antérieurement une grande variété de méthodes de filtrage a été développée suivant le type de bruit, son intensité et les applications. Par leur simplicité d'utilisation et d'analyse, les filtres linéaires ont été les premiers à être proposés pour éliminer le bruit impulsionnel. Les limitations de ces techniques en particulier leurs mauvaises conservations des transitions (contours) et l'impression de flou sur l'image qu'elles introduisent, ont conduit au développement des filtres non-linéaires. Le filtre médian standard est l'un des filtres non linéaires les plus populaires. Il peut supprimer le bruit impulsionnel avec une grande efficacité et robustesse. Toutefois, du fait que chaque pixel est remplacé par la valeur médiane de ses voisins, le filtre médian élimine en plus du bruit, les détails fins de l'image de manière irrémédiable et insère tout de même un petit effet de flou. Pour améliorer les performances du filtre médian et pallier ces défauts, des variantes et également de nouvelles approches ont été proposées. Par la suite, nous allons détailler le filtre médian et ses variantes.

Le filtre Médian est un filtre d'ordre proposé pour la première fois en traitement du signal par Tukey en 1974 (Tukey '74); c'est une approche non linéaire du traitement de signal. Cette approche est bien adaptée pour le lissage des signaux ou la suppression du bruit impulsionnel tout en dégradant très peu les contours. Ce filtre est particulièrement efficace pour éliminer le bruit de type poivre et sel, c'est-à-dire le bruit qui affecte seulement un nombre réduit de pixels, mais modifiant très fortement l'intensité des pixels touchés. Dans le cas d'un signal monodimensionnel, le filtre médian consiste en une fenêtre glissante appelée aussi masque, contenant un nombre impair de pixels. La valeur du pixel central de la fenêtre est remplacée par la valeur médiane de la fenêtre. La médiane d'une séquence discrète de  $N$  éléments avec  $N$  impair et dont les éléments ont été rangés par valeur croissante ou décroissante, est le membre de la séquence d'indice  $(N-1)/2$ . Ce concept de filtre médian peut être facilement étendu à l'image qui est un signal à deux dimensions. Ceci, en utilisant une fenêtre d'observation bidimensionnelle, le plus souvent carrée comme sur l'exemple de la Figure 3.3 mais qui peut être d'une autre forme comme illustrée dans la Figure 3.4. Dans le cas de la Figure 3.3, ce filtre vise à remplacer la valeur du pixel central par la valeur médiane de la répartition des niveaux de gris des pixels situés à l'intérieur de cette fenêtre.

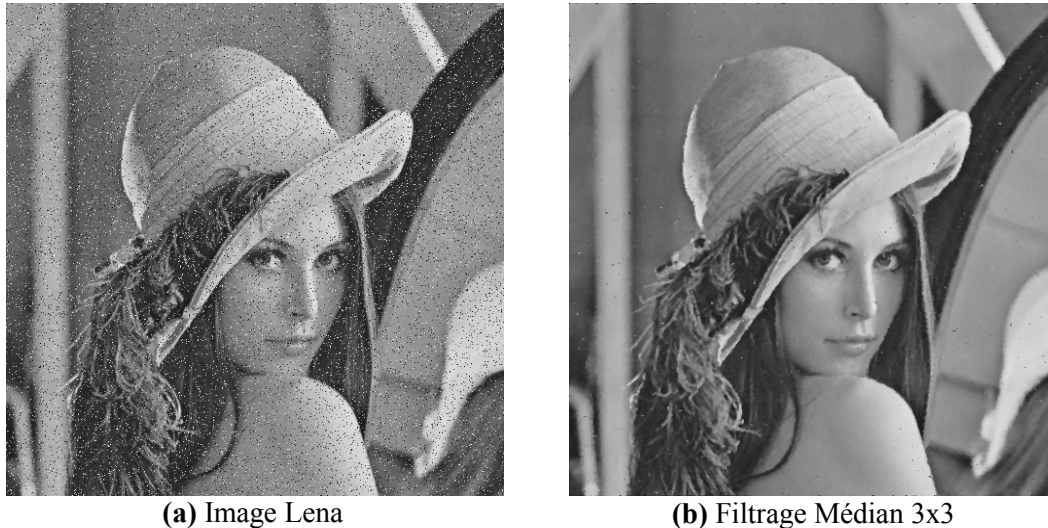


**Figure 3.3 : Exemple de mise en œuvre du filtre médian pour une fenêtre d'observation de 3x3.**



**Figure 3.4 : Exemples de formes de fenêtre de filtrage possibles.**

Ce filtre non linéaire permet d'éliminer des pixels isolés ou des traînées fines noyées dans des zones assez homogènes. La Figure 3.5 présente un exemple d'application de ce filtre sur l'image test ("Lena") bruitée avec un bruit impulsionnel uniformément réparti sur 20% des pixels de l'image. On peut constater que l'image résultante est plus nette, qu'il y a moins de taches isolées par rapport à l'image d'entrée. Le filtre médian permet effectivement la suppression du bruit impulsionnel mais efface les détails fins et arrondit les angles. De plus, il reste un nombre non négligeable de pixels bruités.



**Figure 3.5 : Exemple de filtrage médian (a) Image dégradée avec un bruit aléatoire avec une probabilité de 20%, (b) Résultat du filtrage avec un filtre médian de 3x3.**

Pour compenser ces défauts, la première version modifiée du filtre médian standard (SM) a été le filtre médian pondéré (WM pour weighted median) proposé en 1984 par Brownrigg (Brownrigg '84). La pondération par un paramètre  $W_i$  correspond à la répétition ou à la duplication  $W_i$  fois de la variable  $X_i$ . Cette dernière représente les pixels de la fenêtre d'observation. La sortie du filtre est la médiane des échantillons  $X_i$  pondérés par les coefficients  $W_i$ . Le principe de ce filtre peut être illustré par l'exemple suivant :

Soient  $(x_1, x_2, \dots, x_N)$ ,  $N = 2n+1$  qui représente l'ensemble des pixels de la fenêtre d'analyse et  $(w_1, w_2, \dots, w_N)$  l'ensemble des coefficients de pondération.

La sortie du filtre est donnée par :  $Y = \text{MED}(w_1 \diamond x_1, w_2 \diamond x_2, \dots, w_N \diamond x_N)$ , où  $\text{MED}(\cdot)$  représente le processus de recherche de la médiane et  $\diamond$  représente l'opérateur de duplication. Ce filtre permet par le choix judicieux des coefficients de duplication de privilégier ou d'éliminer des structures ayant une orientation donnée.

Cette première version a été revue pour former le filtre médian pondéré centré. Proposé en 1991 par Ko et Lee (Ko et Lee '91), il donne au pixel central un poids plus

important qu'au reste des pixels de la fenêtre. Cette version permet un compromis entre la préservation des détails de l'image et la suppression du bruit ; plus le poids est grand, plus le filtre préserve les détails mais il est moins efficace en débruitage. Pour plus d'informations, on pourra se reporter à la publication de Lin (Lin et al. '96).

Pour illustrer le principe du filtre médian pondéré centré (CWM pour Center Weighted Median), considérons un exemple d'un filtre médian de 3x3 de fenêtre de pondération est donné par :

$$W = \begin{array}{|c|c|c|} \hline 1 & 1 & 1 \\ \hline 1 & 3 & 1 \\ \hline 1 & 1 & 1 \\ \hline \end{array} \quad X = \begin{array}{|c|c|c|} \hline 20 & 15 & 36 \\ \hline 16 & 5 & 24 \\ \hline 70 & 45 & 16 \\ \hline \end{array}$$

La médiane pondérée, est MED ( $W \diamond X$ ) vaut :

$$\begin{aligned} & \text{MED}(20 \diamond 1, 15 \diamond 1, 36 \diamond 1, 16 \diamond 1, 5 \diamond 3, 24 \diamond 1, 70 \diamond 1, 45 \diamond 1, 16 \diamond 1) \\ & = \text{MED}(20, 15, 36, 16, 5, 5, 5, 24, 70, 45, 16) \\ & = 16 \end{aligned}$$

En 1994, Sun et Neuvo (Sun et Neuvo '94) vont proposer une nouvelle approche : le filtre médian commuté (SWM pour SWitching Median filter). Cette nouvelle approche va donner naissance à une multitude de méthodes pour une bonne élimination du bruit impulsionnel. Le principe de ce filtre repose sur un processus en deux étapes ; une étape de détection suivie d'une étape de décision pour le pixel considéré. La détection des impulsions est basée sur la supposition qu'un pixel bruité aurait tendance à prendre une valeur de niveau de gris substantiellement différente de celles de ses pixels voisins dans la fenêtre de filtrage. Pour les régions de l'image dont les pixels sont non bruités, la variation des niveaux de gris est plutôt lisse et elles peuvent être séparées par des contours. L'étape de détection se met en place en calculant la différence entre la valeur médiane des pixels de la fenêtre de filtrage avec la valeur du pixel courant. Cette différence est comparée à un seuil pour décider ou non de la présence d'impulsions. La sortie du filtre SWM conventionnel  $\hat{Y}_{ij}$  est donnée par :

$$\hat{Y}_{ij} = \begin{cases} m_{ij}, & \text{si } |m_{ij} - X_{ij}| > \text{Seuil}, \\ X_{ij}, & \text{sinon,} \end{cases} \quad (3.3)$$

où  $m_{ij}$  est la valeur médiane de la fenêtre  $W_{ij}$  et *Seuil* est un paramètre prédéfini de valeur fixe. La valeur numérique du Seuil est réglée *a priori* ou choisie après une phase de tests. Il est montré dans la littérature que, pour la plupart des données réelles, un seuil optimal peut être obtenu par une approche au sens de l'erreur aux moindres carrés (Zhou et Zhang '99). Néanmoins, un seuil adapté pour une image donnée n'est pas nécessairement le meilleur choix pour une autre image.

Dans un souci de toujours améliorer l'élimination du bruit impulsionnel, de nouvelles versions ont été proposées comme le filtre médian à trois états proposé par Chen et al. en 1999 (Chen et al. '99), le filtre médian multi états (Chen et Wu '01b) ou le filtre médian pondéré centré adaptatif (Chen et Wu '01a). Le filtre médian à trois états (TSM : Tri-State Median) vise à faire un compromis entre la suppression du bruit impulsionnel et la préservation des détails de l'image. Le principe de ce filtre cherche dans un premier temps à déterminer si le pixel est corrompu. Pour chaque pixel de l'image, les sorties des filtres CWM et SM sont comparées entre elles avec un seuil  $T$  prédéfini. Trois valeurs pour remplacer le pixel étudié sont possibles : la valeur d'origine si le pixel n'est pas bruité, la valeur de sortie du filtre médian standard ou la valeur de sortie du filtre médian pondéré centré. La sortie est choisie parmi les trois en utilisant le seuil  $T$  comme suit :

$$Y_{ij}^{TSM} = \begin{cases} X_{ij}, & \text{si } T \geq d_1, \\ Y_{ij}^{CWM}, & \text{si } d_2 \leq T < d_1, \\ Y_{ij}^{SM}, & \text{si } T < d_2, \end{cases} \quad (3.4)$$

avec,  $d_1 = |X_{ij} - Y_{ij}^{SM}|$  et  $d_2 = |X_{ij} - Y_{ij}^{CWM}|$ .

Les auteurs proposent d'utiliser une valeur de seuil  $T$  comprise entre 10 et 30. Si la distance  $d_2$  est grande (c.-à-d. supérieure au seuil  $T$ ), alors il y a de grandes chances pour que le pixel du centre de la fenêtre soit corrompu et donc pour être sûr de le corriger, on va appliquer le filtrage SM (car ce filtrage accorde moins d'importance au pixel central qui est corrompu). A l'opposé, si  $d_1$  est petite, c'est-à-dire la différence entre le pixel d'origine et le pixel filtré par SM est faible, on garde de préférence le pixel d'origine de façon à préserver les détails. Dans le cas où  $d_2 < T < d_1$ , alors le pixel est peut être corrompu, donc on essaie de le corriger tout en lui accordant un certain poids. On applique alors le filtrage CWM. Le filtre TSM permet ainsi d'allier habilement les avantages des trois filtres précédents. On constate l'importance du seuil  $T$  qui est à choisir de façon optimale. Le filtre médian multi états et le filtre médian

pondéré centré adaptatif proposés par Chen cités précédemment fonctionnent à peu près sur le même principe.

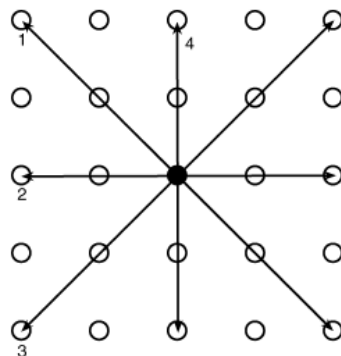
Au cours des dernières années, des méthodes basées sur des techniques floues ont été élaborées pour la suppression du bruit (Van De Ville et al. '03; Xu et al. '04). L'approche floue est bien adaptée pour modéliser l'incertitude qui se produit lorsque la suppression du bruit et la préservation de détails sont nécessaires conjointement. Toutefois, lorsque les images sont fortement corrompues, la mise en place des règles de décision devient assez difficile. Afin de surmonter cette difficulté, des méthodes basées sur le principe neuro-flou sont proposées (Russo '99; Russo '00; Besdok '04). Elles exploitent pleinement la capacité des réseaux de neurones à apprendre à partir d'exemples. Avec un apprentissage approprié et suffisant, elles peuvent conserver plus efficacement les détails de l'image lors de la suppression du bruit. La difficulté de cette approche réside dans la phase d'apprentissage.

Afin de préserver les détails et les contours, une approche intégrant un processus de régularisation a été proposée par Nikolova en 2004 (Nikolova '04). Une première amélioration de cette approche a consisté à intégrer au préalable une phase de détection en exploitant le filtre médian adaptatif pondéré centré (Chan et al. '04). Une autre amélioration a été publiée en 2007 par Dong (Dong et al. '07). Une phase de détection basée sur la statistique de l'image combinée avec le processus de régularisation permet d'obtenir une méthode ayant des performances améliorées en termes de détection de bruit et de restauration. A noter que ces travaux impliquent la minimisation d'une fonction complexe qui est gourmande en temps de calcul.

Reprenant le concept original du filtre médian commuté, en 2002, Zhang et Karim (Zhang et Karim '02) proposent un nouveau détecteur. La sortie du filtre est une combinaison linéaire entre la valeur du pixel central et la médiane de la fenêtre d'observation. Pour cela, il est calculé la valeur minimale de quatre valeurs issues de la convolution de l'opérateur Laplacien dans les quatre directions principales de la fenêtre. A noter que comme les performances des algorithmes exprimées à l'aide du PSNR (Peak Signal to Noise Ratio) et/ou du MAE (Mean Square Error) sont relativement proches, les auteurs commencent à s'intéresser au nombre de pixels non détectés et à celui des fausses détections. Et dans le but de faire diminuer ces deux indicateurs, Yuan et Tan (Yuan et Tan '06) proposent un détecteur qui alterne une détection globale avec une détection locale. Un autre détecteur est également publié par Luo en 2006 (Luo '06). Ce dernier est basé sur le calcul de la moyenne tronquée qui est un cas particulier des filtres d'ordre statistique. La sortie de son filtre est alors une

combinaison linéaire de la valeur originale du pixel et de la valeur médiane de la fenêtre d'observation. Un autre algorithme composé d'un détecteur combinant deux lois de détection, suivi d'un filtre basé sur une fonction de coût est présenté en 2007 par Yuan et al (Yuan et al. '07). Bien que performant, ce filtre a une structure assez complexe et présente des temps d'exécution en moyenne quatre fois supérieurs par rapport aux temps d'exécution des autres filtres testés par les auteurs. Toujours en 2007 et dans le but de détecter les pixels bruités le mieux possible, Dang et Luo (Dang et Luo '07) décrivent dans leur publication un détecteur en deux étapes suivi d'un processus qui estime la valeur originale de chaque pixel considéré bruité. Ce travail reprend celui publié par Ng et Ma (Ng et Ma '06) qui donne de bons résultats pour le bruit poivre et sel. Il utilise comme estimation de la sortie du filtre le même procédé que le filtre médian commuté. L'originalité est dans le détecteur qui se compose d'une détection initiale qui fait intervenir trois seuils après avoir calculé la différence entre chaque paire de pixels adjacents et arrangé les résultats par ordre croissant. Cette première étape est suivie d'une étape de raffinement qui permet d'éliminer les cas extrêmes ; dans la première étape, il est possible qu'un pixel déclaré sans bruit le soit quand même. Pour éliminer ces cas, le résultat de la première étape est comparé à deux seuils prédéfinis. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite un jeu de cinq seuils à redéfinir pour notre application.

Un filtre donnant de très bons résultats est introduit également en 2007 par Dong (Dong et Xu '07). Le détecteur d'impulsion adopte une approche basée sur la différence entre le pixel courant et ses voisins alignés dans les quatre directions principales (voir Figure 3.6).



**Figure 3.6 : Les quatre directions principales.**

Dans chaque direction, on calcule la valeur absolue de la somme des différences pondérées  $d_{ij}^k$ . Elle s'exprime comme exposé ci-après.



Dans chaque direction, la pondération utilisée est pour une prise en compte de la distance entre le pixel central et le pixel considéré et il est affecté un poids plus important à un pixel proche du pixel central. Puis il n'est conservé que la valeur minimale de cette entité  $d_{ij}^k$ , qui correspond à une direction donnée et qui, comparée à un seuil  $T$ , permet de déclarer si un pixel est bruité ou non. La sortie du filtre  $u_{ij}$  est une combinaison linéaire de la valeur du pixel central avec la valeur *médiane*. Ceci s'exprime par la formule suivante :

$$u_{ij} = \alpha_{ij} y_{ij} + (1 - \alpha_{ij}) m_{ij}, \quad (3.5)$$

$$\text{avec,} \quad \alpha_{ij} = \begin{cases} 0, & r_{ij} > T \\ 1, & r_{ij} \leq T. \end{cases} \quad (3.6)$$

$$r_{ij} = \min \{d_{ij}^k : 1 \leq k \leq 4\}, \quad (3.7)$$

où,  $d_{ij}^k$  représente la somme des valeurs des niveaux de gris contenus dans chacune des quatre directions principales dans la fenêtre d'observation. Il s'exprime comme suit :

$$d_{ij}^k = \sum_{(s,t)} w_{s,t} |y_{i+s,j+t} - y_{i,j}|, \quad 1 \leq k \leq 4, \quad (3.8)$$

$$\text{avec,} \quad w_{s,t} = \begin{cases} 2, & (s,t) : -1 \leq s,t \leq 1 \\ 1, & \text{sinon} \end{cases}, \quad (3.9)$$

$$m_{ij} = \text{médiane} \{ \tilde{w}_{s,t} \diamond y_{i+s,j+t} : (s,t) : -1 \leq s,t \leq 1 \}, \quad (3.10)$$

$$\text{et,} \quad \tilde{w}_{s,t} = \begin{cases} w_m, & (s,t) \in S_{ij}^0 \\ 1, & \text{sinon} \end{cases}, \quad \text{et } \diamond \text{ l'opérateur de répétition.} \quad (3.11)$$

Dans son article, Dong propose de choisir le poids  $w_m = 2$ .  $S_{ij}^0$  représente la direction principale pour laquelle  $d_{ij}^k$  est minimale.

Il est constaté que le filtre proposé est lié au seuil  $T$  et que les auteurs proposent de le déterminer de manière itérative en fixant un seuil initial  $T_0$  et en le faisant décroître au cours des itérations. Ce qui s'écrit comme :

$$T_0 = 510 \text{ et } T_{n+1} = T_n * 0,8, \quad (3.12)$$

où,  $T_0$  est le seuil initial et  $T_n$  est la valeur du seuil obtenu à la  $n^{\text{ième}}$  itération.

Les résultats obtenus par rapport à des approches précédentes assez récentes, sont meilleurs en termes de PSNR et de MAE mais également en fonction de la somme du nombre de pixels bruités non détectés et du nombre de pixels non bruités identifiés comme bruités.

A partir de cet état de l'art, nous constatons que la meilleure approche reste celle du filtrage médian commuté au sens de la qualité du filtrage et de la complexité algorithmique. Par contre, il est nécessaire de prédéfinir un seuil ou plusieurs pour certaines approches. Que ce soit dans les travaux démarrés à partir de ceux de Sun et Neuvo (Sun et Neuvo '94) jusqu'à ceux de Dong (Dong et Xu '07), le seuil est global pour toute l'image. Il est choisi à partir d'une démarche synthétique qui consiste à bruite une image connue puis à appliquer un procédé de filtrage. La validation des approches proposées est effectuée en mesurant les valeurs d'indicateurs de performances (PSNR, MAE, ...). Mais le seuil obtenu sur des images que l'on trouve dans les banques d'images (LENA, PEPPERS, ...) n'est pas forcément bien adapté à nos images biomédicales. Après avoir donné la définition des critères de performances, nous proposons dans la suite de ce chapitre, un détecteur qui fournira un seuil local adapté à chaque fenêtre d'observation.

### 3.3.1 Mesures de performances

Les performances de la restauration des images sont évaluées en calculant le pic du rapport signal à bruit (PSNR : Peak Signal to Noise Ratio) et l'erreur moyenne absolue (MAE : Mean Absolute Error) qui sont définies respectivement comme suit :

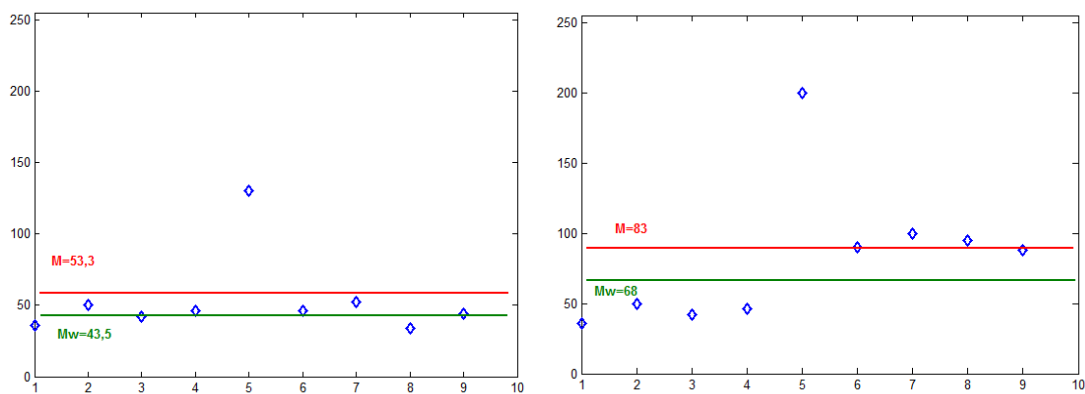
$$PSNR = 10 \log_{10} \left( \frac{\sum_i \sum_j 255^2}{\sum_i \sum_j (Y_{ij} - \hat{Y}_{ij})^2} \right) (dB), \quad (3.13)$$

$$MAE = \frac{1}{M \times N} \sum_i \sum_j |Y_{ij} - \hat{Y}_{ij}|, \quad (3.14)$$

où  $Y_{ij}$  et  $\hat{Y}_{ij}$  désignent la valeur des pixels de l'image originale et de l'image restaurée respectivement. Pour une image codée sur huit bits, 255 est le niveau de gris maximum de l'image pour une image codée sur 8 bits.  $M \times N$  est la taille de l'image.

### 3.4 Un nouveau détecteur pour le filtre médian commuté

Une première remarque est que le résultat de la sortie des filtres médian commutés dépend d'un seuil dont la valeur est fixe sur toute l'image. A ce principe de seuil global, nous pensons qu'il est souhaitable d'avoir un seuil dont la valeur s'adapte automatiquement à l'image voire à toutes les parties de l'image; nous préconisons un seuil adaptatif local. Pour illustrer ces propos, nous avons considéré deux grands cas. Tout d'abord considérons une fenêtre  $W$  de petite taille ( $3 \times 3$ ). Cette fenêtre placée sur l'image peut se situer soit dans une zone homogène (objet ou fond) ou dans une zone présentant un contour (frontière de deux objets de niveaux de gris différents). Un pixel bruité de la fenêtre va se démarquer des autres valeurs de niveaux de gris. Ce qui peut se schématiser comme représenté en Figure 3.7 dans laquelle les niveaux de gris des pixels de la fenêtre sont considérés comme un jeu de valeurs d'un échantillon.



**Figure 3.7 : Exemple de deux échantillons d'une fenêtre  $3 \times 3$  qui contiennent un pixel corrompu. Les valeurs des niveaux de gris des pixels sont représentées sur ces deux graphiques. Les lignes rouges représentent la moyenne standard pour chacun des neufs pixels de la fenêtre. La ligne verte représente la moyenne pondérée.**

Dans le SWM, la valeur du pixel central de la fenêtre est comparée à la valeur médiane qui n'est pas la valeur la plus représentative des valeurs contenue dans la fenêtre. Par exemple, dans le cas où deux zones de niveaux de gris moyen différents sont présentes dans cette fenêtre, la médiane peut prendre comme valeur un niveau de gris d'une des deux zones. Dans ce cas, la moyenne serait plus représentative que la médiane. Mais le calcul de cette dernière est influencé par la présence du pixel bruité par l'impulsion comme indiqué par la valeur  $M$  de la Figure 3.7. Nous proposons donc de comparer la valeur du pixel central avec celui de la moyenne pondérée (Akkoul et al. '09a) (ce calcul sera détaillé dans le paragraphe suivant) qui sera un meilleur estimateur de la valeur moyenne de l'échantillon en présence

d'un point aberrant (§ valeur  $M_w$  de la Figure 3.7). Comme la majorité des points se situent autour de la moyenne pondérée, on peut ensuite calculer l'écart-type pondéré (Akkoul et al. '09a). Il est alors possible de définir la valeur d'un seuil local (un seuil par fenêtre d'observation) qui sera une valeur proportionnelle à cet écart-type pondéré. Les données comprises entre la moyenne pondérée plus au moins ce seuil peuvent être considérées comme non bruitées. A l'extérieur, les valeurs sont considérées bruitées. Pour cette raison, nous avons nommé ce filtre, filtre médian commuté adaptatif (ASWM pour Adaptive SWitching Median). La sortie du filtre suit la loi de décision suivante :

$$\hat{Y}_{ij} = \begin{cases} m_{ij}, & \text{si } |X_{ij} - M_w(i, j)| > \text{Seuil}, \\ X_{ij}, & \text{si non,} \end{cases} \quad (3.15)$$

où  $M_w(i, j)$  est la moyenne pondérée,  $m_{ij}$  est la valeur médiane de la fenêtre d'observation  $W_{ij}$  et  $\text{Seuil} = \alpha \times \sigma_w(i, j)$ ,  $\sigma_w(i, j)$  est l'écart-type pondéré et  $\alpha$  est un paramètre que nous allons étudié après avoir exposé l'algorithme de calcul de la moyenne pondérée et de l'écart-type pondéré.

### 3.4.1 Calcul de la moyenne pondérée et de l'écart type pondéré

L'algorithme de calcul de la moyenne pondérée se déroule de la manière suivante : après une phase d'initialisation de  $M_w(i, j)$  dans laquelle la valeur des poids (paramètres de pondération) associés à chaque pixel vaut un, un processus itératif permet d'estimer cette valeur moyenne ainsi que la valeur de chaque poids. Le processus stoppe sur un critère de convergence. Suite à ce calcul, la valeur de l'écart-type pondéré est estimée.

#### **Initialisation :**

Dans cette phase, la valeur notée  $\omega_{k,l}$  des poids associés aux pixels de la fenêtre vaut l'unité. Une valeur initiale de la moyenne pondérée  $M_w(i, j)$  est calculée dans la fenêtre  $(2L+1) \times (2L+1)$  autour du pixel considéré. Cette valeur est obtenue à l'aide de l'expression suivante :

$$M_w(i, j) = \frac{\sum_{k,l} \omega_{k,l} X_{i+k, j+l}}{\sum_{k,l} \omega_{k,l}}, \quad (3.16)$$

où  $X_{ij}$  est la valeur du niveau de gris de l'image X localisé en (i, j) et les  $\omega_{k,l}$  sont les poids associés aux pixels de la fenêtre (égaux à 1 dans cette phase d'initialisation). La variation des indices k et l est  $-L < k < L$  et  $-L < l < L$ .

### **Phase itérative :**

**Etape 1:** Estimation des poids  $\omega_{k,l}$  et nouveau calcul de  $M_w(i, j)$ .

De manière, à ce qu'un pixel bruité ait moins d'importance qu'un pixel proche de la moyenne, la valeur des poids  $\omega_{k,l}$  est inversement proportionnelle à la différence entre les valeurs des niveaux de gris et la moyenne de ces mêmes niveaux. Ces poids sont obtenus comme suit :

$$\omega_{k,l} = \frac{1}{|X_{i+k,j+l} - M_w(i, j)| + \varepsilon_p}. \quad (3.17)$$

La valeur  $\varepsilon_p$  a été ajoutée à la différence pour éviter le cas indéterminé de la division par zéro, ce qui se produit lorsque la valeur de la moyenne  $M_w(i, j)$  est égale à la valeur du niveau de gris  $X_{i,j}$ .  $\varepsilon_p$  sera choisi ultérieurement.

Une nouvelle valeur de la moyenne pondérée  $M_w(i, j)$  est alors recalculée à l'aide de l'équation 3.16.

**Etape 2 :** Critère d'arrêt

La valeur de la moyenne pondérée est estimée itérativement jusqu'à la convergence de l'algorithme. L'arrêt des itérations est obtenu en comparant la différence entre les valeurs de la moyenne pondérée obtenues pour deux itérations successives avec la valeur d'un paramètre  $\varepsilon$  très petite. Ce critère de convergence s'écrit comme suit :

$$|M_w(i, j)^t - M_w(i, j)^{t-1}| < \varepsilon, \quad (3.18)$$

où  $M_w(i, j)^t$  et  $M_w(i, j)^{t-1}$  sont respectivement les moyennes pondérées obtenues à l'itération t et t-1.

Tant que cette différence est supérieure à  $\varepsilon$ , l'algorithme retourne à l'étape 1 sinon les itérations s'arrêtent.

**Phase finale :** calcul de l'écart-type pondéré

Suite au calcul de la moyenne pondérée, nous calculons l'écart type pondéré  $\sigma_w(i, j)$  à l'aide de l'expression :

$$\sigma_w(i, j) = \sqrt{\frac{\sum_{k,l} \omega_{k,l} (X_{i+k, j+l} - M_w(i, j))^2}{\sum_{k,l} \omega_{k,l}}} \quad (3.19)$$

Pour illustrer le résultat du calcul de la moyenne pondérée et ce que représente la valeur de l'écart-type pondéré, considérons les deux exemples suivant (Figure 3.8) pour une fenêtre d'observation de 3x3 pixels.

63	61	62
60	60	64
211	56	62

(a)

$$M = 77,6, \quad \sigma = 50$$

$$M_w = 61,8, \quad \sigma_w = 3,4$$

66	66	62
70	241	65
64	73	64

(b)

$$M = 85,6, \quad \sigma = 58,3$$

$$M_w = 66, \quad \sigma_w = 3,8$$

( M : Moyenne,  $\sigma$  : Ecart type,  $M_w$  : Moyenne pondérée,  $\sigma_w$  : Ecart type pondéré)

**Figure 3.8 : Exemple de deux fenêtres d'observation : dans le cas (a) le pixel central n'est pas bruité mais la fenêtre contient un pixel bruité, dans le cas (b) le pixel central est bruité.**

Dans le cas (a), le pixel central considéré n'est pas corrompu mais la fenêtre d'observation contient un pixel bruité. De ce fait, la moyenne M des niveaux de gris de la fenêtre n'est pas le reflet réel des valeurs contenues dans cette fenêtre, l'écart type est lui aussi très élevé au regard des valeurs des niveaux de gris de la fenêtre. Il en est de même dans le cas b. Cependant, il est facile de constater à partir de la Figure 3.8 que la moyenne pondérée  $M_w$  n'est pas influencée par le pixel bruité et qu'elle est un bon estimateur de la valeur moyenne, c'est le cas aussi de l'écart type pondéré.



**Figure 3.9 : Valeurs de  $\sigma_w$  pour l'image Lena.**

Un exemple de résultat du calcul de l'écart type pondéré sur l'image "Lena" est présenté sur la Figure 3.9. On peut constater sur cette image que les valeurs de l'écart type pondéré ne sont pas homogènes sur toute l'image. Elles sont faibles quand la zone est homogène et deviennent plus importantes quand la zone de calcul présente des contours ou des textures. Il apparaît donc judicieux d'utiliser cet écart type pondéré pour fixer un seuil local (dans chaque fenêtre d'observation) dans la procédure du filtre ASWM, comme proposé dans l'équation 3.15.

### **3.4.2 Sélection des paramètres**

La méthode proposée fait appel à quatre paramètres qui sont :

- La valeur de  $\varepsilon$  pour le critère d'arrêt lors de l'estimation itérative de la moyenne pondérée,
- La valeur de  $\varepsilon_p$  dans la formule de calcul des poids.
- La taille de fenêtre d'observation  $W$ ,
- Et enfin, la valeur du paramètre  $\alpha$  qui multiplié par l'écart- type pondéré  $\sigma_w(i, j)$  définit la valeur du seuil.

Le paramètre  $\varepsilon$  est la limite supérieure de la différence entre la valeur moyenne pondérée à deux itérations successives. Une petite valeur de  $\varepsilon$  peut être utilisée pour une bonne estimation de  $M_w(i, j)$ . Il faudra tout de même vérifier la convergence de l'algorithme. Nous avons choisi  $\varepsilon = 0,01$ .

Le paramètre  $\varepsilon_p$  permet d'éviter des cas de division par zéro lors du calcul des poids associés aux pixels d'une fenêtre d'observation. La valeur de  $\varepsilon_p$  doit être choisie judicieusement. En effet, quand la valeur du pixel est très proche de la valeur de la moyenne pondérée, la différence entre ces deux valeurs est très faible ( $\ll 1$ ) et l'inverse est grand. Mais en ajoutant par exemple la valeur 1 à la différence, l'inverse devient proche de 1 voire inférieur alors que l'on cherche à avoir une forte valeur. Pour pallier ce mauvais conditionnement, nous proposons de fixer cette valeur à 0.1 ce qui permet d'avoir des valeurs de poids plus représentatifs de l'écart entre la moyenne pondérée et la valeur du niveau de gris du pixel.

La détermination de la taille de la fenêtre  $W$  et le choix de la valeur de  $\alpha$  sont interconnectés. Ce problème peut être modélisé sous forme d'un test d'hypothèse (Bendat et Piersol '71). Nous définissons les deux hypothèses  $H_0$  et  $H_1$  comme étant :

$$\begin{cases} H_0 : \text{aucun bruit impulsionnel n'est présent.} \\ H_1 : \text{le bruit impulsionnel est présent.} \end{cases} \quad (3.20)$$

Le but est d'avoir un détecteur de bruit impulsionnel minimisant à la fois les erreurs de Type I (probabilité de refuser  $H_0$  quand aucun bruit impulsionnel n'est présent) et de Type II (probabilité d'accepter  $H_0$  quand le bruit impulsionnel est présent). Afin de réduire les erreurs de type I, pour un  $\sigma_w(i, j)$  donné, il faut choisir la valeur  $\alpha$  de telle sorte qu'elle ne soit ni trop élevée (ne pas détecter les pixels bruités), ni trop petite (fausse détection : détection de pixel non bruités comme étant bruité). Si nous supposons que les fluctuations naturelles d'une région uniforme d'une image sont gaussiennes (à l'exclusion du bruit impulsionnel), les valeurs du niveau de gris des pixels  $X_{i,j}$  de cette région non bruités sont tels que  $|X_{i,j} - M_w(i, j)| < \alpha \times \sigma_w(i, j)$ .

Afin de réduire les erreurs de type II, la région d'acceptation doit être la plus petite possible c'est-à-dire la valeur  $\alpha$  qui multiplie l'écart type pondéré  $\alpha \times \sigma_w(i, j)$  est petite. Dans le cas où la taille de la fenêtre d'observation est petite, il se peut que l'image soit « lisse »



(valeurs des niveaux de gris proches) dans cette région, ce qui minimise la variance  $\sigma_w^2(i, j)$  dans cette zone. Nous avons donc choisi  $L = 1$  ce qui correspond à une fenêtre de  $3 \times 3$ .

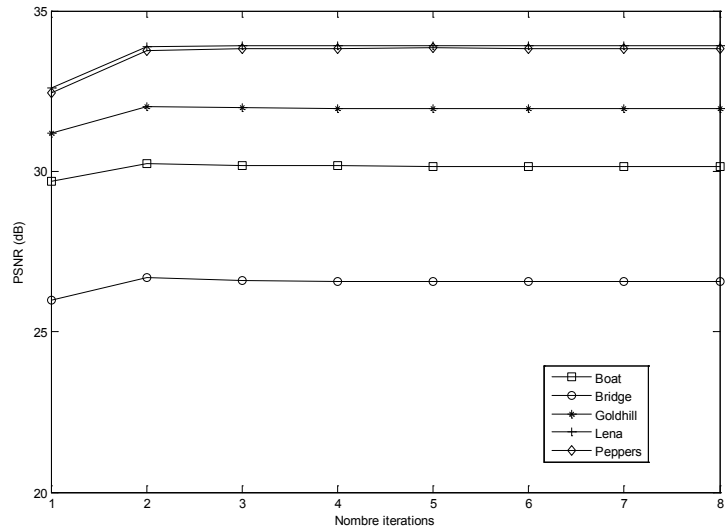
Pour le réglage du seuil de décision qui est fixé comme étant proportionnel à l'écart-type (c.-à-d.,  $\text{Seuil} = \alpha \times \sigma_w(i, j)$ ), nous avons repris l'idée de Dong qui est d'intégrer une procédure itérative pour ce réglage (Dong et Xu '07). L'idée est qu'au début des itérations le seuil est assez haut et les pixels ayant une grande probabilité d'être bruités sont supprimés. Puis le seuil est abaissé au cours des itérations pour prendre en compte plus de pixels susceptibles d'appartenir au bruit. Ainsi au cours des itérations, le seuil va évoluer et ceci de deux manières. Au premier passage, des valeurs centrales des fenêtres d'observation vont donc être modifiées suivant la loi de décision proposée (équation 3.15). Au deuxième passage, vu que les valeurs les plus susceptibles d'être du bruit sont modifiées, la valeur de l'écart-type va diminuer car les valeurs se resserrent autour de la moyenne. Et donc dans ce cas, le seuil diminue. Et ainsi de suite pour les itérations suivantes. Pour assurer une grande précision de détection et rendre ce seuil décroissant même dans les zones où la différence entre la valeur du pixel central et la moyenne pondérée est inférieure au seuil, nous proposons de faire légèrement évoluer le paramètre  $\alpha$  au cours des itérations (Akkoul et al. '10). Ainsi, l'algorithme est appliqué récursivement et itérativement avec un *seuil* décroissant. Les meilleures performances ont été obtenues quand le paramètre  $\alpha$  est choisi comme suit :

$$\alpha_0 = 20 \quad \text{et} \quad \alpha_{n+1} = 0,8 * \alpha_n \quad (3.21)$$

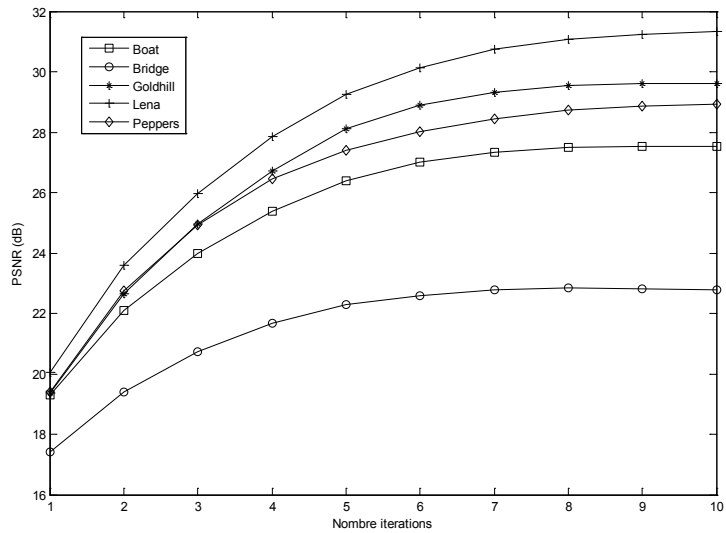
où  $\alpha_0$  est la valeur initiale de  $\alpha$ , et  $\alpha_n$  est la valeur de  $\alpha$  à la  $n^{\text{ième}}$  itération sur l'image. Dans la pratique, l'algorithme converge après seulement quelques itérations (Akkoul et al. '09a). Le nombre maximum d'itérations est compris dans l'intervalle [2, 10].

### 3.4.3 La vitesse de convergence

ASWM est donc une méthode itérative dont il est nécessaire d'évaluer la vitesse de convergence. Pour cela, nous utilisons un ensemble d'images dégradées avec un bruit impulsionnel uniformément repart sur 20% puis sur 40% de l'image de départ. Le PSNR en fonction du nombre d'itérations obtenu pour les deux cas étudiés est présenté respectivement dans la Figure 3.10 et Figure 3.11. Il est ainsi montré que le filtre ASWM converge en très peu d'itérations, pratiquement entre 2 et 10 itérations. La convergence dépend bien sûr du pourcentage de pixels bruités.



**Figure 3.10 : Résultats en termes de PSNR en fonction du nombre d'itérations du filtrage itératif ASWM pour différentes images dégradées sur 20% de ses pixels (bruit impulsionnel aléatoire).**



**Figure 3.11 : Résultats en termes de PSNR en fonction du nombre d'itérations du filtrage itératif ASWM pour différentes images dégradées sur 40% de ses pixels (bruit impulsionnel aléatoire).**

Maintenant que les paramètres d'ASWM sont fixés et que nous avons constaté sa convergence, nous allons comparer cette méthode aux autres filtres médians connus et récents.

### 3.5 Comparaison du filtre ASWM avec quelques autres méthodes retenues

Nous avons comparé le filtre ASWM proposé à d'autres filtres basés médian bien connus comme le filtre Médian Standard (SM) (Gonzalez et Woods '02), le filtre Médian Centré Pondéré (CWM) (Ko et Lee '91), le filtre médian commuté (SWM) (Sun et Neuvo '94), le filtre médian à trois états (TSM) (Chen et al. '99), le filtre basé sur la moyenne tronquée (ATMA pour Alpha-Trimmed Mean based Approach) (Luo '06), le filtre médian commuté modifié (MSWM) proposé par Kang et Wang en 2008 (Kang et Wang '08), et le filtre publié par Dong en 2007 (DWM pour Directional Weighted Median) (Dong et Xu '07). Ces différents filtres sont reconnus comme des méthodes efficaces en termes de suppression du bruit aléatoire. Dans tous les cas, une fenêtre de filtrage de  $3 \times 3$  est utilisée, excepté pour le filtre SM où la taille de la fenêtre est choisie en fonction du niveau de bruit (Gonzalez et Woods '02) et le filtre DWM où une fenêtre de  $5 \times 5$  est préconisée par les auteurs. Pour le filtre CWM, nous avons choisi un poids  $W$  de 3, valeur qui nous semble judicieuse pour faire un bon compromis entre la préservation des contours et la détection des pixels bruités. Les seuils utilisés dans les filtres SWM et TSM sont respectivement 30 et 20 qui sont les valeurs préconisées par les auteurs. Tous les algorithmes sont implémentés de manière récursive. Comme images test, nous avons adopté les images de test utilisées précédemment qui sont, Lena, Bridge, Boat, Peppers, Goldhill et Bridge. Nous avons appliqué des simulations de type Monte Carlo pour différents pourcentages de pixels bruités. Chaque image est dégradée 100 fois par un bruit impulsionnel aléatoire sur les pixels qui sont déterminés bruités par un tirage aléatoire.

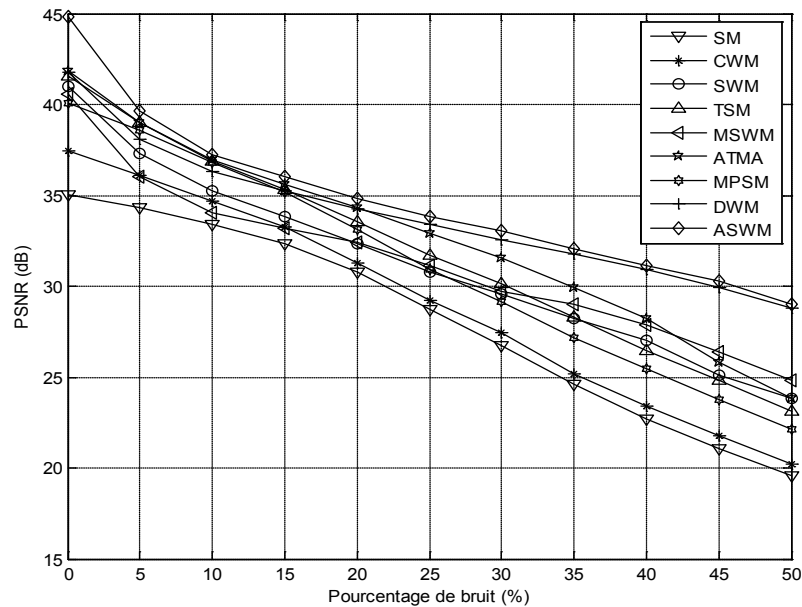
Le PSNR moyen et le MAE moyen obtenus sont rapportés dans le Tableau 3.1. Les résultats montrent que le filtre proposé donne de meilleurs résultats que les autres méthodes considérées en termes de PSNR et de MAE pour cette valeur de pourcentage de pixels bruités.

L'analyse des performances de notre filtre est complétée en étudiant l'évolution du PSNR quand le pourcentage de pixels bruités évolue dans l'intervalle [1%; 50%].

**Tableau 3.1 : PSNR (dB) et MAE pour une probabilité de 30% de bruit impulsionnel aléatoire. Les meilleurs résultats sont donnés en caractères gras.**

Filtres		Lena	Bridge	Goldhill	Boat	Peppers
SM	PSNR	28.16	23.24	26.96	26.03	26.64
	MAE	4.63	10.17	6.16	6.62	5.26
CWM	PSNR	28.60	23.89	27.69	26.55	27.3
	MAE	3.75	8.33	4.95	5.42	4.24
SWM	PSNR	29.84	24.55	29.04	27.25	29.50
	MAE	2.75	6.14	3.31	3.91	2.81
TSM	PSNR	30.71	24.92	29.56	27.82	30.01
	MAE	2.35	6.03	3.06	3.57	2.44
MSWM	PSNR	30.68	24.11	28.95	27.45	28.35
	MAE	3.66	9.39	5.16	5.66	4.32
ATMA	PSNR	31.75	24.97	30.10	28.12	29.13
	MAE	2.12	6.68	3.03	3.52	2.47
DWM	PSNR	32.45	25.50	30.53	28.53	32.51
	MAE	1.98	5.34	2.81	3.32	1.99
ASWM (proposé)	PSNR	<b>32.94</b>	<b>25.62</b>	<b>30.87</b>	<b>28.99</b>	<b>32.96</b>
	MAE	<b>1.81</b>	<b>5.11</b>	<b>2.62</b>	<b>3.00</b>	<b>1.82</b>

La Figure 3.12 montre l'évolution de ce paramètre (PSNR) pour l'image "Peppers" et ceci pour les différents filtres médians considérés. Les résultats obtenus montrent que le filtre ASWM proposé donne de bons résultats pour toute la plage testée.



**Figure 3.12 : Comparaison des performances des différentes méthodes de filtrage de l'image "Peppers" dégradée par différents niveaux de bruit impulsionnel aléatoire.**

Les résultats sont similaires en termes de MAE. Cela confirme que le filtre proposé réalise une bonne restauration et préserve les détails de l'image dans toute la gamme de pourcentage de bruit testé.

Pour illustrer visuellement le résultat obtenu, nous observons la qualité visuelle de la restauration obtenue sur deux images. Le premier résultat concerne l'image "Goldhill" dont 30% des pixels sont dégradés par un bruit impulsionnel aléatoire. Les résultats obtenus sont reportés sur la Figure 3.13. On constate que le filtre médian standard a un effet lissant ce qui était prévisible car il modifie beaucoup de pixels. Le CWM, le SWM, le TSM et le MSWM donnent de bons résultats de restauration, néanmoins il reste quelques pixels bruités sur les images restaurées. Le filtre ATMA, le filtre DWM et le filtre proposé donnent de très bons résultats visuels bien que l'on constate un effet lissant pour le filtre DWM. Cela se remarque notamment au niveau des fenêtres des maisons.

Le second résultat présenté dans la Figure 3.14 concerne l'image "Peppers" dont 40% des pixels sont dégradés. Les résultats visuels montrent que pour une image aussi bruitée la méthode ASWM proposée reste performante en termes d'élimination d'impulsions parasites comparées aux autres méthodes considérées.



Image originale "Goldhill"

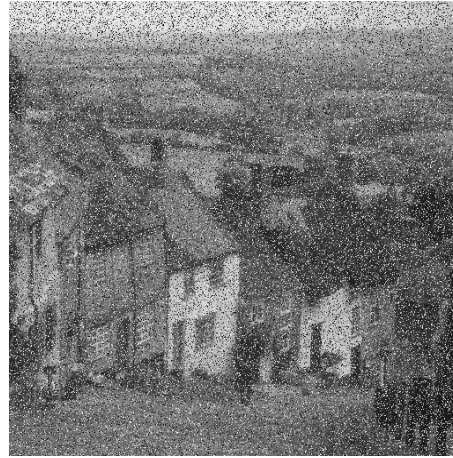


Image bruitée (30%)



SM



CWM



SWM



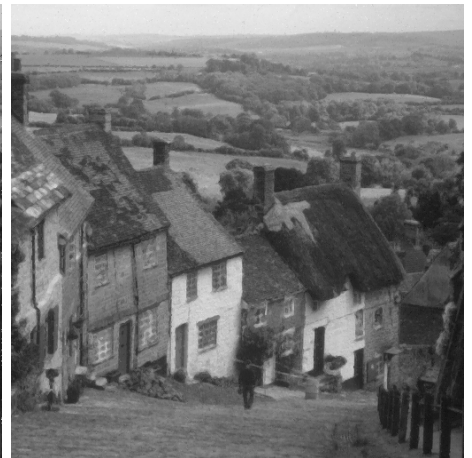
TSM



MSWM



ATMA



DWM



ASWM (proposé)

Figure 3.13 : Comparaison des performances de restauration des méthodes considérées sur l'image "Goldhill" dégradée avec du bruit impulsionnel aléatoire sur 30% de ces pixels.

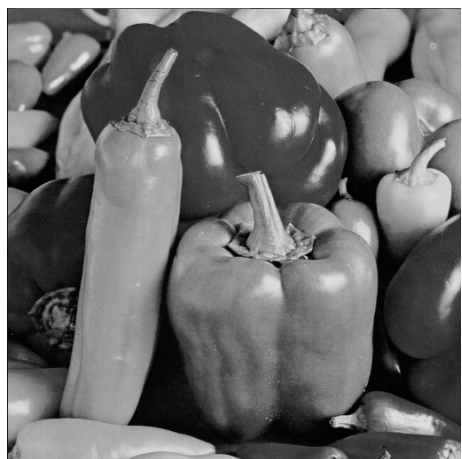


Image originale "Peppers"

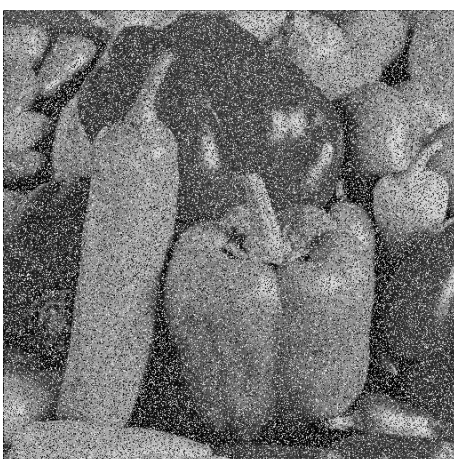
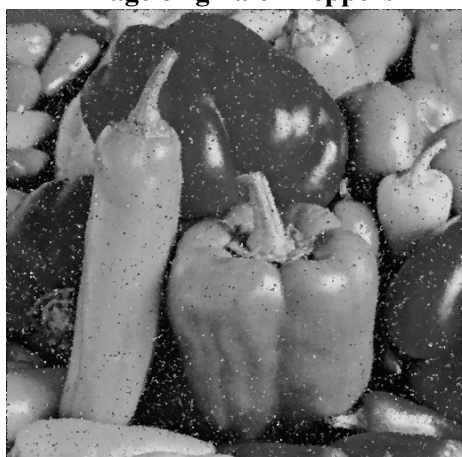


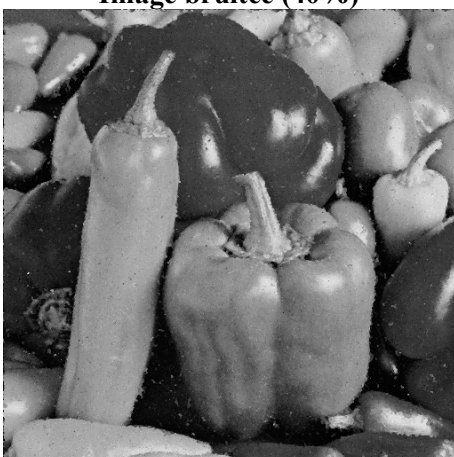
Image bruitée (40%)



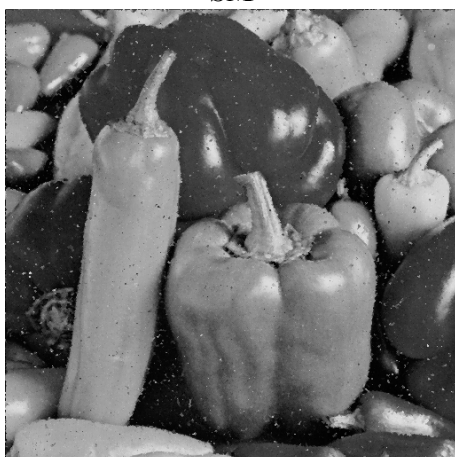
SM



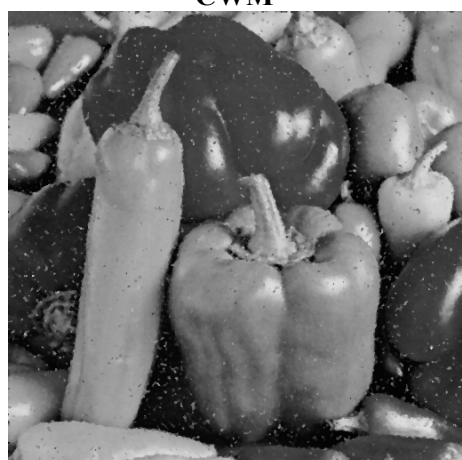
CWM



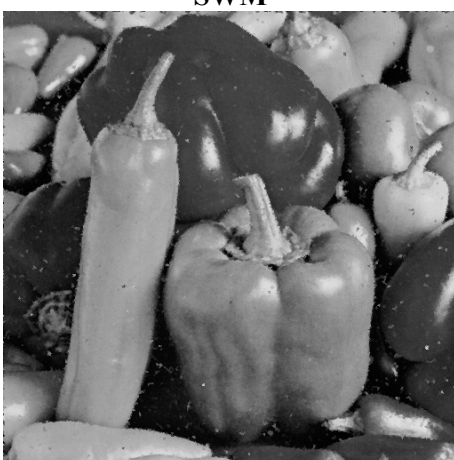
SWM



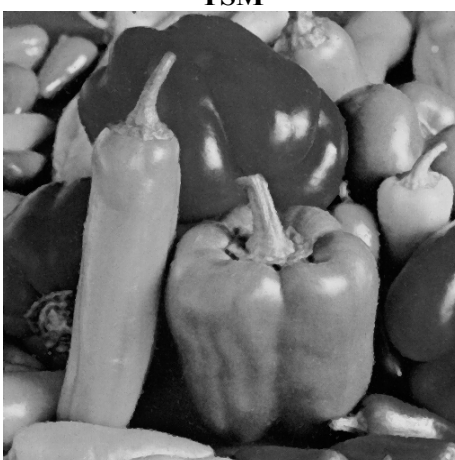
TSM



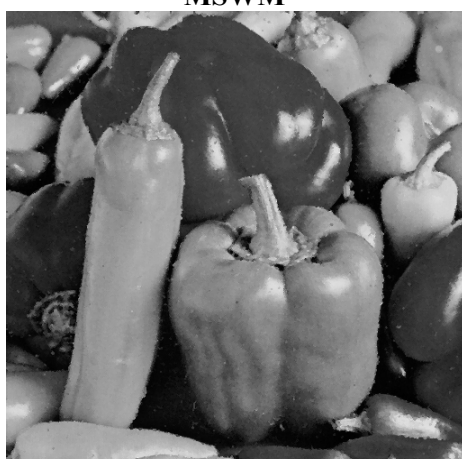
MSWM



ATMA



DWM



ASWM (proposé)

Figure 3.14 : Comparaison des performances de restauration des méthodes considérées sur l'image "Peppers" dégradée avec du bruit impulsionnel aléatoire sur 40% de ces pixels.

### 3.5.1 Mesures du nombre de pixels mal classés

Pour compléter les comparaisons, les auteurs de (Dong et Xu '07) calculent le nombre de pixels bruités non détectés (non détection) et le nombre de pixels non bruités qui sont identifiés comme étant du bruit (fausse détection) pour montrer l'efficacité de leur méthode. Dans ce même but, les auteurs de (Kang et Wang '08) ont défini un taux de détection de bruit. Nous exploitons également ce nombre de pixels non détectés et celui des identifiés par erreur car ils sont de bons indicateurs pour la restauration des détails.

Ici, nous comparons notre méthode avec cinq méthodes proposées récemment. Le Tableau 3.2 indique le nombre de pixels bruités non détecté (ND) ce qui signifie que les pixels sont bruités mais ne sont pas détectés comme un bruit et le nombre de pixels non bruités détectés comme du bruit (FD) (Fausse Détection). Pour le bruit impulsionnel aléatoire, les valeurs des pixels bruités peuvent être proches de celles de leurs voisins. Par conséquent, il est plus facile pour un détecteur de bruit de rater un pixel bruité ou de détecter à tort un pixel non bruité comme bruit (Dong et Xu '07). Un bon détecteur de bruit devrait être en mesure d'identifier la plupart des pixels bruités, et son taux de fausse alerte (fausse détection) devrait être aussi petit que possible. Dans le tableau, nous avons ajouté la somme des pixels mal classés. Quelque soit le pourcentage de pixels bruités, les valeurs de ND, de FD et de leur somme obtenu avec notre filtre sont inférieures à celles des filtres concurrents. Notre filtre peut donc identifier plus de pixels bruités avec moins d'erreurs, le nombre de fausses détections et de non détection sont inférieures comparativement aux autres méthodes.



**Tableau 3.2: Les résultats de comparaison de la détection du bruit pour l'image "Lena" corrompue par un bruit impulsionnel aléatoire. Les meilleurs résultats sont en caractères gras.**

<b>"LENA" Image</b>						
Méthodes	<b>5%</b>		<b>10%</b>		<b>20%</b>	
	N.D	F.D	N.D	F.D	N.D	F.D
SWM	1364	2262	2532	2439	5084	3030
	Som = 3626		Som = 4971		Som = 8114	
TSM	1349	1781	2515	1855	5037	2510
	Som = 3130		Som = 4307		Som = 7547	
MSWM	1527	114353	2953	108799	5674	98062
	Som = 115880		Som = 111752		Som = 103736	
ATMA	1247	4169	2350	4916	4667	5502
	Som = 5416		Som = 7266		Som = 10169	
DWM	1274	550	2562	1364	5368	2901
	Som = 1824		Som = 3926		Som = 8269	
ASWM	<b>834</b>	<b>297</b>	<b>1594</b>	<b>1279</b>	<b>3019</b>	<b>4362</b>
	<b>Som = 1131</b>		<b>Som = 2873</b>		<b>Som = 7381</b>	
Méthodes	<b>30%</b>		<b>40%</b>		<b>50%</b>	
	N.D	F.D	N.D	F.D	N.D	F.D
SWM	6869	3739	8333	4796	9484	6406
	Sum = 10608		Sum = 13129		Sum = 15890	
TSM	6763	2628	8167	3380	9190	4514
	Som = 9391		Som = 11547		Som = 13704	
MSWM	7674	87387	8115	105859	8475	94844
	Som = 95061		Som = 113974		Som = 103319	
ATMA	6295	6337	7469	7953	7922	10551
	Som = 12632		Som = 15422		Som = 18473	
DWM	7691	5061	9567	7507	11035	7342
	Som = 12752		Som = 17074		Som = 18377	
ASWM	<b>4083</b>	<b>4227</b>	<b>4180</b>	<b>4497</b>	<b>4735</b>	<b>8613</b>
	<b>Som = 8310</b>		<b>Som = 8677</b>		<b>Som = 13348</b>	

(N.D : Non Détection, F.D : Fausse Détection et Som : Somme)

Notre méthode peut distinguer la plupart des pixels bruités, même lorsque le niveau de bruit est élevé et permet de restaurer le maximum de détails.

Un dernier résultat visuel est présenté sur la Figure 3.15, il montre un zoom sur le résultat de filtrage obtenu sur l'image « Lena » bruitée avec 30% de bruit aléatoire et cela pour chacune des méthodes considérées.



**Figure 3.15 : Comparaison des performances de restauration sur l'image "Lena" dégradée de 30% de bruit impulsif aléatoire ; seul, une partie de l'image "Lena" est montrée pour mieux visualiser la qualité de la restauration.**

Le filtre ASWM proposé montre d'excellentes performances psycho visuelles par rapport aux autres méthodes considérées. Ce résultat est d'une grande importance pour la suppression du bruit impulsionnel.

### **3.6 Conclusion**

Dans ce chapitre, suite à l'état de l'art sur le filtrage médian qui est celui par excellence dédié au filtrage du bruit impulsionnel, il est apparu que le concept du SWM était le mieux adapté. Mais jusqu'à présent le seuil fixé pour cette technique était global sur toute l'image. Nous avons proposé une nouvelle méthode de détection basée sur le calcul de la moyenne pondérée et de l'écart type pondéré. Ce dernier nous a permis de définir un seuil local adaptatif. L'algorithme est itératif et au cours des itérations, le seuil s'adapte aussi. Comparé aux derniers filtres publiés, nous avons montré que notre filtre présentait des performances supérieures, qu'il permettait de préserver au mieux les détails. Il reste à trouver un moyen pour stopper les itérations et ce filtre sera optimal.

## 4 Restauration des images de bioluminescence

***Résumé :** Ce chapitre est consacré à l'étude et à la comparaison de différentes approches de déconvolution d'images pour sélectionner celle qui sera la plus adaptée aux images de bioluminescence. Après avoir posé le problème de la déconvolution, nous présenterons une classification des algorithmes considérés pour cette étude. Dans la suite de ce chapitre, à l'aide de la réponse impulsionnelle du système d'acquisition mesurée expérimentalement et en utilisant le modèle de formation des images de bioluminescence défini dans le chapitre 2, nous avons généré des images de synthèse pour faire la comparaison quantitative des différentes méthodes de déconvolution. Ceci nous permet de sélectionner les plus efficaces pour la restauration des images de bioluminescence. Nous avons testé leurs performances en termes de qualité de restauration et de vitesse de convergence. Pour ce faire, nous avons utilisé les critères de comparaison les plus couramment utilisés dans la littérature et nous avons introduit un nouveau paramètre qui nous a permis de bien discriminer les méthodes.*

### 4.1 Introduction

La déconvolution des images numériques remonte à la fin des années cinquante et le début des années soixante (Demoment '85). Les travaux étaient menés par des scientifiques impliqués dans les programmes spatiaux des Etats-Unis et de l'ex-Union Soviétique (Katsaggelos et al. '91). Bon nombre de ces programmes spatiaux avait pour but l'acquisition d'images de la terre et du système solaire. Cependant, les images acquises durant les missions planétaires étaient entachées de nombreuses dégradations ce qui entraînait une perte d'informations dévastatrice. La nécessité de récupérer les informations perdues a conduit la communauté scientifique à travailler sur des algorithmes qui permettent d'extraire des informations significatives à partir des images dégradées. La restauration des images

numériques n'est nullement limitée aux exemples énumérés précédemment. Elle concerne tous les domaines de la physique appliquée et donc une large variété d'applications, comme l'imagerie médicale.

Plusieurs modalités d'imagerie médicale sont devenues des standards. Elles sont disponibles en grande partie dans presque tous les hôpitaux du monde entier. En même temps, l'amélioration de la qualité et de la fiabilité du diagnostic par imagerie médicale représente toujours un défi permanent pour beaucoup de scientifiques travaillant dans ce domaine (Campisi et Egiazarian '07). De plus, avec l'avènement de nouvelles modalités d'imagerie, l'exigence et les besoins de la part des médecins et des chercheurs augmentent en termes de qualité. Ces nouveaux besoins font que le traitement d'images devient incontournable. Avant de parler des traitements proprement dits, il est impératif de comprendre les raisons qui ont motivé ces développements. Ces raisons sont diverses et variées mais les trois plus importantes identifiées par (Campisi et Egiazarian '07) sont :

1. La première raison est le besoin d'une détection précoce de maladies (notamment en oncologie<sup>6</sup>) pour une prise en charge précoce du patient et ainsi augmenter ses chances de survie. La détection précoce implique une plus grande résolution des outils de diagnostic. La résolution, est limitée par les propriétés physiques de la modalité et par des considérations techniques liées à l'acquisition des données. Dans de tels cas, pour améliorer la résolution des images afin de permettre aux cliniciens de diagnostiquer une maladie à ses premiers stades de développement, des méthodes de post-traitement efficaces sont nécessaires.
2. La deuxième raison est liée à la tendance du marché des équipements médicaux à vouloir exiger des équipements plus abordables en termes de prix (pays émergents). Comme conséquence, les images acquises sont de moins bonne qualité que celles obtenues avec des outils plus sophistiqués. Le traitement d'images est donc envisagé pour restaurer la qualité.
3. La dernière raison est liée à l'application elle-même qui impose dans des cas d'études la réduction de la qualité des images obtenues, notamment lors d'observation de phénomènes transitoires, ceci pour avoir une quantité de données raisonnable ; c'est le cas aussi pour les outils miniaturisés (pour les rendre portatifs).

---

<sup>6</sup> L'oncologie ou carcinologie ou cancérologie est la spécialité médicale d'étude, de diagnostic et de traitement des cancers. Un médecin qui pratique cette discipline est appelé *oncologue* ou *cancérologue*. Le terme vient du grec *onkos*, signifiant vrac, masse ou tumeur, et le suffixe *-logie*, signifiant « étude de ». (Source : Oncology, J Rouessé, F Turpin, Masson 1993).

Les raisons citées ci-dessus montrent la nécessité de développer des méthodes de traitement du signal et d'images efficaces pour améliorer la résolution et le contraste des images médicales. Ces traitements ne doivent en aucun cas altérer l'information contenue dans l'image et les temps de traitement doivent rester raisonnables.

Dans la suite de ce chapitre, après un état de l'art sur les méthodes de déconvolution, nous proposons dans cette thèse une classification des méthodes en cinq classes. Pour une comparaison quantitative, nous exploitons notre modèle de formation d'images pour créer des images de synthèse. Les paramètres de comparaison sont ceux exploités couramment dans la littérature. Le choix final de la méthode de déconvolution repose sur l'analyse des valeurs de ces paramètres de comparaison. L'amélioration de la résolution spatiale par une atténuation des effets de diffusion de la peau, permettra une meilleure localisation des sources lumineuses et ainsi une augmentation du pouvoir séparateur de sources très petites. On peut rechercher la meilleure restitution des bords des sources pour des mesures géométriques, ce qui conduira à connaître l'évolution temporelle de tumeurs. Il est également envisageable de restituer le niveau de lumière émise car cette dernière est proportionnelle au nombre de gènes émissifs. Pour valider le choix de la méthode retenue pour une exploitation en routine, nous avons mené des validations terrains qui seront présentées au chapitre suivant.

#### **4.1.1 Etat de l'art de la déconvolution**

La déconvolution représente une large partie du domaine de traitement des images numériques consacrée à l'imagerie médicale (Richardson '72; Lucy '74; Stockham et al. '75; Dempster et al. '77; Shepp et Vardi '82; Webb et al. '85 ; Ayers et Dainty '88; Katsaggelos '89; Biemond et al. '90; Charalambous et al. '91; Katsaggelos et al. '91; Holmes '92; Snyder et al. '93; Kundur et Hatzinakos '96a; Kundur et Hatzinakos '96b; Banham et Katsaggelos '97; Van Kempen et al. '97; Waniak '97; Kundur et Hatzinakos '98; Lehr et al. '98; Mignotte et Meunier '00; Wang et al. '04; Dey et al. '06; Sarder et Nehorai '06). La majorité de ces techniques utilisées dans la déconvolution d'images tentent de modéliser la dégradation et/ou le bruit et ensuite appliquent une procédure inverse pour obtenir une approximation de l'image originale. Puisque la déconvolution d'images est un problème mal-posé au sens de Hadamard (Hadamard '23) comme la majorité des problèmes inverses, la plupart de ces techniques utilisent la théorie de la régularisation. Dans ce cas, la solution est alors choisie suivant différents critères selon la méthode de régularisation choisie; l'idée étant toujours d'obtenir la stabilité de l'opérateur inverse, c'est-à-dire trouver une solution proche de la solution idéale.

Cette théorie de régularisation implique l'utilisation de contraintes liées au type de signal que nous traitons. La manière dont nous utilisons ces contraintes affecte l'efficacité de l'algorithme (Starck et al. '02). Un exemple de contrainte couramment utilisée est la non-négativité, ce qui signifie que toutes les valeurs des pixels qui résultent du processus de déconvolution doivent être positives. Ces contraintes contribuent à réduire l'ensemble des solutions réalisables. En outre, les contraintes peuvent être mises sur le bruit qui est une partie intrinsèque de toutes les images mesurées. La présence du bruit est un facteur critique qui rend le processus de déconvolution particulièrement difficile. En principe, la déconvolution ne devrait pas poser de problème particulier dès lors qu'on connaît la réponse impulsionnelle (PSF) qui représente l'inverse de la dégradation subi par l'image. En réalité, les images sont toujours plus ou moins bruitées, et le processus de restauration est instable en présence de bruit. Le but de la restauration est de rétablir les détails de petites dimensions, aux échelles spatiales où le bruit est important. Atténuer le bruit et restaurer les détails sont deux opérations contradictoires. La déconvolution d'image de par sa difficulté a donné lieu à un grand nombre de travaux et une multitude de méthodes ont été proposées. Notre but est de sélectionner celle qui serait la plus à même à répondre à notre problématique qui concerne la déconvolution d'images de bioluminescence.

Dans le paragraphe suivant, nous proposons un classement similaire à celui publié par Sarder et Nehorai (Sarder et Nehorai '06).

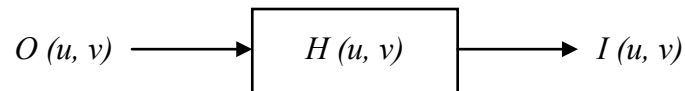
#### **4.1.2 Les classes des méthodes de déconvolution**

Les méthodes de déconvolution peuvent être regroupées selon plusieurs critères. Par exemple Jalobeanu (Jalobeanu '01) dans sa thèse propose de les regrouper en deux classes en utilisant la notion d'échelle, la classe monoéchelle qui englobe toutes les méthodes sauf celles basées ondelettes et la classe multiéchelles englobant toutes les méthodes basées ondelettes. Les auteurs dans (Sarder et Nehorai '06) classent les méthodes de déconvolution en six grandes classes qui sont les méthodes non basées sur le voisinage, les méthodes basées sur le voisinage (plus utilisées dans la restauration d'images 3D), les méthodes linéaires, les méthodes non linéaires, les méthodes statistiques et enfin les méthodes aveugles, l'auteur parle aussi de la possibilité d'utiliser les ondelettes (multiéchelles) avec des algorithmes de déconvolution classiques comme phase de régularisation. Ce deuxième classement nous semble plus représentatif et rend compte de la richesse des méthodes de déconvolution. Ces méthodes, nous les avons classées pour notre part, en cinq grandes catégories; les méthodes

linéaires, les méthodes non linéaires, les méthodes statistiques, les méthodes basées ondelettes et enfin les méthodes aveugles.

#### 4.1.2.1 Méthodes linéaires

Le premier modèle de dégradation adopté pour la formation d'image est le modèle linéaire qui est modélisé comme suit :



**Figure 4.1 : synoptique de formation d'une image sans prise en compte du bruit.**

où  $I$  est l'image obtenue à la sortie du système d'acquisition,  $H$  est la réponse fréquentielle du système et  $O$  est l'image réelle.

Le filtre inverse est sans conteste l'une des premières approches à être utilisée dans la déconvolution d'images et cela à partir des années 1960. Un filtre inverse est généralement un filtre linéaire dont la réponse impulsionnelle (PSF) est l'inverse de la fonction de dégradation subi par l'image. La mise en œuvre de ce filtre dans le domaine spatial peut être difficile. En revanche, l'équivalent spectral est généralement plus facile. En l'absence de tout bruit, on peut écrire :

$$I(u, v) = H(u, v)O(u, v) \Rightarrow \hat{O}(u, v) = \frac{I(u, v)}{H(u, v)}, \quad (4.1)$$

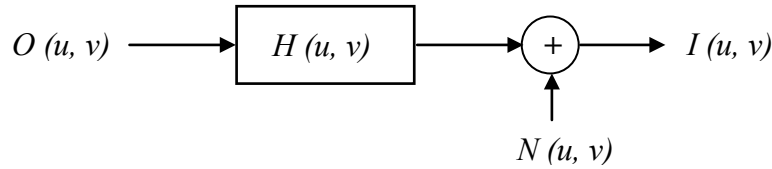
où  $\hat{O}$  est l'image restaurée proche de l'image réelle  $O$ .

L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite, en tant qu'*a priori*, que la connaissance de la PSF. Elle est très rapide en temps de calcul et permet la restauration parfaite de l'image à condition que la réponse fréquentielle n'ait aucune fréquence nulle ou proche de zéro (singularités) et que l'image ne contienne pas de bruit. Lorsque le bruit est présent dans l'image, ses effets sont irrémédiablement amplifiés par cette technique. C'est le cas aussi pour les fréquences proches de la fréquence de coupure, le terme du bruit devient important. C'est pour cette raison que cette méthode ne peut pas être utilisée en présence de bruit.

Pour remédier aux insuffisances de cette approche et surmonter sa sensibilité au bruit, il a été développé un certain nombre de filtres de restauration qui s'appellent collectivement "les filtres moindres carrés". Les filtres les plus communément utilisés dans cette catégorie sont le



filtre de Wiener et le filtre des moindres carrés avec contraintes (Dhawan et al. '85; Banham et Katsaggelos '97; Lagendijk et Biemond '00). Un modèle plus réaliste intégrant le bruit peut se schématiser suivant le synoptique de la Figure 4.2.



**Figure 4.2 : Synoptique de formation d'une image dans le domaine de Fourier avec prise en compte du bruit.**

où  $N(u, v)$  représente le bruit associé à l'acquisition.

Le filtre de Wiener est un filtre linéaire spatialement invariant dans lequel la réponse impulsionnelle est choisie de telle sorte qu'elle minimise l'erreur quadratique moyenne (EQM) entre l'image idéale et l'image restaurée. Cette minimisation de l'erreur quadratique moyenne entre l'image originale et l'image restaurée s'écrit comme suit :

$$EQM = E[(o(x, y) - \hat{o}(x, y))^2], \quad (4.2)$$

où  $o$  est l'image idéale,  $\hat{o}$  est l'image restaurée et  $E$  est l'espérance mathématique.

Ce critère tend à réduire la différence entre l'image restaurée et l'image idéale. La solution à ce problème de minimisation est facilement défini dans le domaine spectral comme étant le filtre de Wiener (Lagendijk et Biemond '00; Gonzalez et Woods '02) :

$$\hat{O}(u, v) = I(u, v) \frac{H^*(u, v)}{H^*(u, v) H(u, v) + \frac{S_B^2(u, v)}{S_O^2(u, v)}}, \quad (4.3)$$

où  $\hat{o}$  est l'image restaurée,  $I$  est l'image acquise,  $H$  et  $H^*$  sont respectivement l'équivalent fréquentiel de la réponse impulsionnelle et son conjugué complexe et  $s_O$ ,  $s_B$  sont respectivement les puissances spectrales de l'image idéale et du bruit. Dans la situation typique où une image est bruitée, cette approche fait un compromis entre la restauration par filtrage inverse et la suppression du bruit pour les fréquences où la réponse fréquentielle est proche ou égale à zéro (Lagendijk et Biemond '00). Bien qu'elle soit facile à mettre en œuvre, cette approche nécessite une bonne connaissance du spectre du bruit.

La méthode des moindres carrés avec contraintes est une alternative pour surmonter le problème du filtre inverse, c'est à dire l'amplification excessive du bruit, ainsi que celui qu'a le filtre de Wiener pour l'estimation de la puissance spectrale de l'image idéale. Cette approche est mise en œuvre en utilisant l'information préalable déterministe à propos de l'image originale en tant que paramètre de régularisation (Legendijk et Biemond '00). Cette méthode est basée sur la minimisation de l'écart quadratique entre l'image acquise ( $i$ ) et l'image estimée ( $\hat{o}$ ) convoluée avec la PSF tenant ainsi compte du phénomène de flou. Cet écart s'écrit comme suit :

$$\|i(x, y) - h(x, y) * \hat{o}(x, y)\|^2 \quad (4.4)$$

où,  $\|\cdot\|^2$  représente la norme euclidienne.

La solution pour un tel problème par une minimisation directe ne conduira pas à la solution escomptée. Cela est dû au fait que les hautes fréquences de " $\hat{o}$ " ne sont pas prise en compte et sont mis à zéro par la convolution avec  $h$ .

Trouver une estimée pour  $\hat{o}$  à partir de (4.4) est connu comme étant un problème mal posé (Tikhonov et Arsenin '77). Pour résoudre ce problème, Tikhonov a défini une solution régularisée connue sous le nom de fonctionnelle de Tikhonov (Tikhonov et Arsenin '77). Elle est exprimée comme :

$$\phi(o(x, y)) = \arg \min \|i(x, y) - (h * o)(x, y)\|^2 + \lambda \|c * h\|^2, \quad (4.5)$$

où,  $\|\cdot\|^2$  représente la norme euclidienne, le premier terme  $\|i(x, y) - (h * o)(x, y)\|^2$  représente la fidélité aux données  $i(x, y)$ , et le second terme  $\lambda \|c * h\|^2$  se rapporte au lissage appliqué à l'image restaurée :  $c$  est un filtre passe-haut (appelée aussi matrice de régularisation),  $\lambda$  est le paramètre de régularisation, il représente le compromis entre la fidélité aux données (l'image originale) et la douceur de l'image restaurée. La minimisation de cette fonction conduit à la solution connue sous le nom de Tikhonov-Miller qui est aisément formulée dans le domaine de Fourier sous cette forme :

$$\hat{O}(u, v) = I(u, v) \frac{H^*(u, v)}{H^*(u, v)H(u, v) + \lambda C^*(u, v)C(u, v)}, \quad (4.6)$$

où  $\hat{O}$  est l'image restaurée,  $I$  est l'image acquise,  $H$  et  $H^*$  sont respectivement l'équivalent fréquentiel de la réponse impulsionnelle et son conjugué complexe et  $C$ ,  $C^*$  sont respectivement un filtre passe haut dans le domaine spectral et son conjugué complexe. Typiquement pour le filtre passe haut on utilise l'opérateur Laplacien.

Il est à noter qu'en comparant l'équation (4.4) et (4.6) on constate que la solution obtenue par

$$\text{Tikhonov-Miller est égale à celle de Wiener quand : } \lambda C^*(u, v)C(u, v) = \frac{S_B^2(u, v)}{S_O^2(u, v)}$$

Cette méthode est simple à implémenter mais elle est très sensible aux erreurs sur les données de la PSF utilisée pour l'estimation ; ce qui conduit à des artefacts dans l'image restaurée.

#### 4.1.2.2 Méthodes non linéaires

Pour résoudre les difficultés survenant dans la première classe, des contraintes ont été intégrées dans ces méthodes linéaires. Historiquement, l'algorithme de Jason-Van Cittert (1939) est la première méthode itérative de déconvolution avec contraintes (Sarder et Nehorai '06). C'est un algorithme itératif qui converge rapidement. Mais il n'est pas très efficace dans le cas d'images ayant un rapport signal à bruit (SNR : Signal to Noise Ratio) faible. Par la suite, cet algorithme a été amélioré par l'introduction d'autres contraintes comme par exemple la limitation de l'intensité du signal. Une approche non linéaire de l'algorithme de Tikhonov-Miller a été également proposée. Le minimum de la fonction de Tikhonov est obtenu itérativement en mettant les intensités négatives obtenues à zéro après chaque itération. Habituellement, une méthode basée Gradient Conjugué (GC) est utilisée pour l'opération de recherche itérative (Press et al. '92). Au cours des itérations, la plus grande pente en direction du minimum de la fonction est calculée (une descente de gradient). La direction du gradient conjugué  $d$  est donnée par cette équation :

$$d_k = r_k + \xi_k d_{k-1}, \quad (4.7)$$

où, pour la  $k^{\text{ième}}$  itération  $\xi_k$  vaut :

$$\xi_k = \frac{\|r_k\|^2}{\|r_{k-1}\|^2}, \quad (4.8)$$

avec,  $r_k$  étant la direction du pas de descente, qui est donné par :

$$r_k = (H^T H + \lambda C^T C) \hat{O} - H^T I, \quad (4.9)$$

avec,  $^T$  l'operateur transposé et  $\lambda$  un paramètre de régularisation.

Finalement, une nouvelle estimée basée sur le gradient conjugué est obtenue comme suit :

$$O_{k+1} = \begin{cases} O_k + s_k p_k & \text{si } O_k + s_k p_k \geq 0, \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}, \quad (4.10)$$

où  $s_k$  est la taille optimale du pas de descente et  $p_k$  est la direction du gradient conjugué.

En conclusion, nous constatons que les méthodes vues jusqu'à présent sont des méthodes de filtrage, qui n'ont qu'un effet régularisant sur l'image dégradée. L'image résultat, dans le cas du filtre Wiener, converge vers une solution des moindres carrés et pour la méthode de Van Cittert la solution tend vers l'inverse généralisé. De plus, toutes les méthodes citées ci-dessus sont basées sur l'hypothèse que le bruit de dégradation peut être modélisé par un modèle de bruit Gaussien additif. Ce qui n'est pas toujours le cas, notamment quand il s'agit d'une collecte de photons à faible flux par un détecteur où il est admis que la statistique qui régit ce phénomène obéit à une loi de Poisson (statistique de Poisson). C'est le cas en imagerie astronomique (Snyder et al. '93), ou encore dans bon nombre de modalités d'imagerie médicale (Shung et al. '92).

#### 4.1.2.3 Méthodes statistiques

Pour prendre en considération d'autres modèles physiques, notamment ceux liés à un processus de Poisson, des méthodes statistiques ont été proposées. Les méthodes statistiques sont basées sur la règle de Bayes :

$$P(o/i) = P(i/o)P(o) / P(i), \quad (4.11)$$

où  $P(o/i)$  représente la fonction de densité de probabilité (pdf) de l'objet "o" sachant "i". Le terme  $P(o)$  désigne la densité de probabilité de l'image réelle et  $P(i/o)$  représente la probabilité a priori.

L'objectif est de trouver une estimation de l'image originale "o" qui maximise la probabilité *a posteriori*  $P(o/i)$ . La maximisation de la partie droite de l'équation (4.11) donne une solution "o". Ce résultat est obtenu par la maximisation de la densité  $P(i/o)$  sur "o" (solution par maximum de vraisemblance (ML en anglais : pour maximum likelihood)) ou par la maximisation du produit  $P(i/o) P(o)$  (solution par maximum *a posteriori* (MAP)). Dans les

deux cas, la densité de probabilité de l'image  $P(i)$  n'intervient pas ; elle est considérée comme étant une valeur constante qui n'influe pas sur le processus de maximisation et de ce fait elle est ignorée. Si on assure une densité de probabilité uniforme, la solution par maximum de vraisemblance est équivalente à la solution par MAP. L'algorithme de base de la résolution de ce problème de maximisation est l'algorithme de Lucy-Richardson (Richardson '72; Lucy '74) qui est aussi appelé parfois (car identique) la méthode EM (Expectation Maximisation) (Shepp et Vardi '82). C'est une technique itérative, largement mise en œuvre dans les méthodes de restauration basées sur l'approche de Bayes. Elle est couramment utilisée dans la restauration d'images astronomiques (Lucy '74; Lantéri et al. '02; Starck et al. '02). C'est le cas aussi en restauration d'images issues de modalités d'imagerie médicale comme l'imagerie nucléaire et l'imagerie confocale (Dempster et al. '77; Banham et Katsaggelos '97; Chomik '97; Van Kempen et al. '97; Van De Ville et al. '03; Dey et al. '06; Oleg et Dan '07). L'algorithme de Lucy-Richardson est obtenu comme suit (les détails du calcul sont donnés en annexe A, page 140) :

Pour un modèle poissonien, la fonction de vraisemblance de l'image observée  $I$  conditionnelle à l'image source  $O$ , sous condition que les pixels de l'image soient statistiquement indépendants s'écrit :

$$p(I/O) = \prod_{x,y} \frac{[(h * O)(x, y)]^{I(x,y)} \exp\{- (h * O)(x, y)\}}{I(x, y)!}, \quad (4.12)$$

Le maximum est ensuite obtenu en annulant la dérivée du logarithme de  $p(I/O)$  par rapport à  $O$  :

$$\frac{\partial \ln p(I/O)(x, y)}{\partial O(x, y)} = 0, \quad (4.13)$$

En normalisant la réponse impulsionnelle et en utilisant les itérations de Picard, on obtient une formule itérative qui est aussi appelé algorithme de Richardson-Lucy :

$$O_{n+1}(x, y) = \left[ \frac{I(x, y)}{(h * O_n)(x, y)} * h(-x, -y) \right] \cdot O_n(x, y), \quad (4.14)$$

où  $I(x, y)$  est l'image à déconvoluer (l'image acquise par le système),  $O_{n+1}(x, y)$  est l'image obtenues à la  $(n+1)^{\text{ième}}$  itération de l'algorithme,  $h(x, y)$  est la réponse impulsionnelle du

système d'acquisition,  $h(-x,-y)$  est le conjugué de  $h(x, y)$ . Pour assurer une meilleure convergence et une plus grande stabilité de l'algorithme, des contraintes peuvent être appliquées à cet algorithme comme la positivité ; à chaque itération de l'algorithme les valeurs négatives obtenues sur l'image résultat sont mises à zéro. Une autre contrainte comme la conservation du flux peut être assurée par la normalisation de la réponse impulsionnelle.

#### 4.1.2.4 Méthodes basées ondelettes

L'utilisation de la transformation en ondelettes a suscité beaucoup de travaux en raison de sa capacité à représenter une image à différentes résolutions. Certains de ces algorithmes proposent un procédé d'estimation inverse qui combine l'analyse de Fourier avec l'approche par ondelettes (Neelamani et al. '99). Plus précisément, les algorithmes proposés comportent un système d'inversion dans le domaine de Fourier qui se traduit par un filtre inverse régularisé permettant à l'algorithme de fonctionner même lorsque le système est non-inversible. Ce processus est généralement suivi de la suppression du bruit dans le domaine des ondelettes (par exemple par la mise à zéro des coefficients non significatifs). L'ensemble fonctionne en utilisant l'erreur quadratique moyenne pour trouver un équilibre optimal entre la régularisation du domaine de Fourier (adapté au système) et la régularisation du domaine d'ondelettes (adapté au signal/image). Un autre algorithme, présenté par (Figueiredo et Nowak '03) propose une approche "Expectation-Maximisation" (EM) pour la restauration d'images basée sur le maximum de vraisemblance pénalisé qui est formulé dans le domaine des ondelettes. Dans cet algorithme, la régularisation est réalisée en favorisant une reconstruction avec une faible complexité exprimée en termes de coefficients d'ondelettes et tire profit de la parcimonie de la représentation en ondelettes. Le problème, en général, avec des méthodes basées sur la représentation en ondelettes est que la plupart d'entre elles nécessitent des méthodes d'optimisation très exigeantes, car l'opérateur de convolution est généralement très difficile à représenter dans le domaine des ondelettes. Ceci suggère naturellement la possibilité de combiner la déconvolution basée sur Fourier et le débruitage basé sur les ondelettes. La méthode dans (Jalobeanu et al. '02) propose un algorithme de déconvolution basé également sur le procédé EM. Ici, le problème de déconvolution est réglé en utilisant une technique de débruitage. Cette approche consiste à alterner une étape "Landweber" (méthode de régularisation) (Landweber '51) et une étape de débruitage. Cette dernière est effectuée en utilisant une transformée en ondelettes complexes, assurant à la fois les propriétés d'invariance par translation et par rotation et un modèle *a priori* spatialement adaptatif. Un

autre algorithme appelé DeQuant(Jammal et Bijaoui '99; Jammal '01; Jammal et Bijaoui '04), propose une méthode de restauration multiéchelle permettant l'estimation du paramètre d'un processus de Poisson à partir d'une seule réalisation du processus dans un contexte de rapport signal sur bruit faible. DeQuant est basé sur un test statistique qui permet de séparer les coefficients d'ondelette significatifs contenant l'information des coefficients non significatifs. Une contrainte de régularisation attribue une nouvelle valeur pour ces derniers. Enfin, la transformée en ondelettes inverse permet d'obtenir l'image restaurée. L'application aux images de médecine nucléaire traitées par les auteurs donne des résultats encourageants. Nous l'avons également testé pour nos images de bioluminescence (Berkache '09b).

#### **4.1.2.5 Méthodes aveugles**

Les méthodes de déconvolution aveugles représentent la dernière classe des algorithmes considérés. Les performances des méthodes précédentes sont basées sur une bonne connaissance de la réponse impulsionnelle (PSF) et également du bruit (Kundur et Hatzinakos '96a; Du et Voss '04). Les méthodes de déconvolution aveugles semblent plus appropriées lorsque la PSF associée au système est inconnue ou partiellement connue, ce qui est le cas lors de relevés expérimentaux de la PSF (il n'est obtenu qu'une bonne estimation de cette fonction). Comme résumé dans (Kundur et Hatzinakos '96a), différentes raisons motivent l'utilisation de la déconvolution aveugle dans les applications d'imagerie médicale. Dans ce domaine, pratiquement il est souvent coûteux, dangereux, voire physiquement impossible d'obtenir des informations *a priori* sur l'image de la scène. De plus, les dégradations que subit l'image acquise ne peuvent pas être toujours parfaitement spécifiées. Dans d'autres applications, les exigences physiques pour améliorer la qualité des images sont irréalisables. Par exemple en imagerie à rayons X, l'amélioration de la qualité des images est conditionnée par l'augmentation de la quantité de rayon X incidents, ce qui peut s'avérer dangereux pour la santé du patient. Dans tous ces cas, la déconvolution aveugle s'avère être une bonne alternative pour améliorer la qualité des images sans avoir recours à des méthodes compliquées à calibrer.

Il existe une grande variété de méthodes de déconvolution basée sur des approches aveugles. Une première revue de ces méthodes a été faite par Kundur et al. (Kundur et Hatzinakos '96a; Kundur et Hatzinakos '96b). Récemment, le livre édité par Campisi et al. (Campisi et Egiazarian '07) est un recueil de plusieurs articles qui présentent différentes approches

utilisées pour la déconvolution aveugle. Ce livre a été aussi la base de l'état de l'art sur la déconvolution aveugle de la thèse de Soulez Ferréol (Soulez '08).

Le terme Blind deconvolution (pour deconvolution aveugle) a été utilisé pour la première fois dans (Stockham et al. '75). Mais le concept de la déconvolution aveugle date des travaux fait sur les signaux par Oppenheim (Oppenheim et al. '68). Au fil des années, une multitude de méthodes a été développée dans ce même but. Néanmoins, ce problème mal posé est difficile. La plupart des algorithmes proposés ne sont pas satisfaisants en termes de stabilité, de robustesse, d'unicité et de convergence. Reste que c'est un domaine qui connaît un développement rapide du fait de son importance et de la multitude d'applications possibles. Un grand nombre de ces algorithmes de déconvolution aveugle dérivent des modèles de calcul probabiliste et utilisent la même approche que les algorithmes itératifs contraints. Ils sont désignés sous l'appellation IBD (pour : Itérative Blind Deconvolution). On trouve aussi des algorithmes de déconvolution aveugle basés sur le recuit simulé ainsi que l'algorithme NAS-RIF pour filtrage inverse récursif avec contraintes sur la non négativité et le support (en anglais : A nonnegativity and Support constraints Recursive Inverse Filtering) (Kundur et Hatzinakos '96a; Kundur et Hatzinakos '96b). L'une des techniques les plus populaires est la méthode développée par Holmes et al. (Holmes '92). Elle est basée sur l'algorithme EM qui est aussi désigné sous le nom de Lucy et Richardson. Le principe de cet algorithme est qu'en plus de l'estimation de l'image originale une estimation de la PSF est faite à chaque itération. Il s'écrit comme suit :

$$O_{n+1}(x, y) = \left[ \frac{I(x, y)}{(h * O_n)(x, y)} * h(-x, -y) \right] \cdot O_n(x, y), \quad (4.15)$$

$$h_{n+1}(x, y) = \left[ \frac{I(x, y)}{(h * O_n)(x, y)} * O_n(-x, -y) \right] \cdot h_n(x, y), \quad (4.16)$$

où,  $O(-x, -y)$  est le conjugué de  $O(x, y)$ .

De plus, à chaque itération, il est imposé à la PSF des contraintes de conservation d'énergie, de support fini, et de non négativité. L'inconvénient majeur de cette approche est que la solution va dépendre des valeurs initiales. Une des solutions est que la PSF estimée peut être injectée pour une meilleure convergence vers la solution.



### 4.1.3 Conclusion

De cet état de l'art, il en ressort que les méthodes les plus efficaces sont les méthodes itératives qui corrigent la PSF progressivement. Elles convergent vers le même résultat que le filtrage inverse, mais passent par un stade où la PSF est déjà notablement corrigée avant que le niveau de bruit ne remonte de façon inacceptable. Tout l'art de la chose consiste à arrêter le traitement avant de faire apparaître des artefacts à haute fréquence.

Dans ce qui suit, nous allons comparer les différentes méthodes de déconvolution d'images dont nous avons parlé précédemment. Nous testerons leurs performances en termes de vitesse de convergence et de qualité de restauration. Pour cela, nous utiliserons les critères de comparaison les plus couramment utilisés. Nous utiliserons des images de synthèse représentant des objets bioluminescents de tailles différentes obtenus par le modèle de dégradation que nous avons défini pour les images de bioluminescence. Nous utiliserons aussi la PSF obtenue expérimentalement.

### 4.1.4 Mesure de performances

Dans la littérature, la qualité de la déconvolution d'image est évaluée à l'aide du paramètre classique qu'est l'erreur quadratique moyenne (EQM). Il existe d'autres paramètres comme le I-Divergence mais ce dernier ne peut pas s'appliquer à toutes les méthodes retenues, car il impose un critère de non négativité. Pour être cohérent avec toutes les méthodes considérées, nous ne l'avons pas retenu. Dans ce travail, nous utilisons principalement l'EQM. L'EQM mesure la différence d'énergie entre les deux images comparées à savoir l'image restaurée et l'image de départ considérée comme référence. L'EQM est donné par :

$$EQM = \frac{1}{MN} \sum_{x,y} |O(x,y) - \hat{O}(x,y)|^2, \quad (4.17)$$

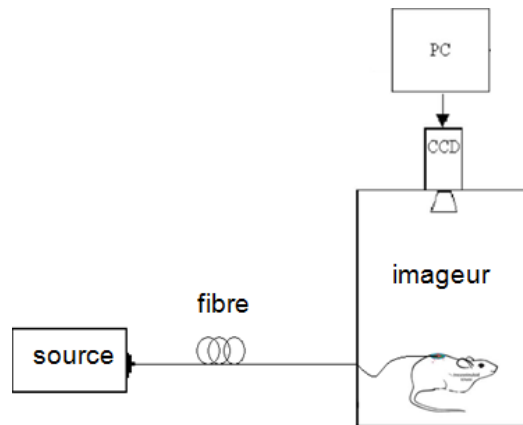
avec,  $O$  image avant dégradation,  $\hat{O}$  image après déconvolution et  $M \times N$  est la taille de l'image.

Mais cette mesure est globale et il est parfois difficile de choisir la meilleure méthode parmi plusieurs. Ainsi, afin d'évaluer pleinement la réussite de nos procédures de déconvolution, nous utilisons un critère d'évaluation spécifique basé sur celui proposé par (Webb et al. '85 )

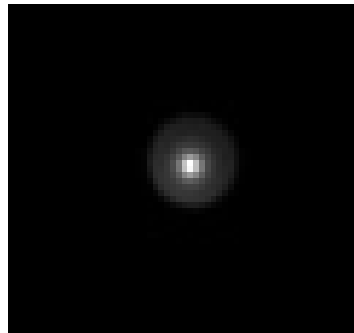
et utilisé par Mignotte et Meunier pour les images SPECT (Mignotte et Meunier '00). Nous définissons les régions d'intérêt (ROI) qui sont des zones sur les objets d'intérêt dans l'image de synthèse. Dans ces domaines précis, nous calculons la moyenne des niveaux de gris pour la comparer au niveau de gris de la même ROI dans l'image originale. En outre, l'écart-type dans cette ROI est calculé. Ce qui permet d'examiner les niveaux de gris restitués dans les objets ainsi que les variations à l'intérieur des ROI. Pour une bonne restauration, la valeur de la moyenne doit tendre vers la valeur initiale obtenue sur l'image originale et l'écart type doit diminuer et tendre vers zéro.

#### **4.1.5 La réponse impulsionnelle du système**

La connaissance de la réponse impulsionnelle du système d'acquisition ou au moins une estimation est nécessaire pour la plus part des processus de déconvolution. Pour notre étude nous disposons d'un système d'acquisition commercialisé par la société Hamamatsu (Macroscopic Imaging AEQUORIA system). Nous avons effectué un relevé expérimental de la PSF de la chaîne d'acquisition complète (Akkoul et al. '08). L'application choisie concerne les tumeurs sous-cutanées qui représentent 80% des tumeurs étudiées. Nous avons enregistré la PSF du système d'acquisition en intégrant la peau de la souris in vivo afin de prendre en compte les phénomènes d'absorption et de diffusion de cette partie de l'animal. Le système d'acquisition réalisé se compose d'une source de lumière ponctuelle. Cette source est obtenue à l'aide d'une fibre optique dont le diamètre du cœur est égal à 200  $\mu\text{m}$ ; diamètre inférieur à la taille d'un pixel de l'image (la taille du pixel est de 300 $\mu\text{m}$ ). Cette fibre optique est reliée à une source de lumière blanche. Cette lumière est filtrée à l'aide de deux filtres interférométriques pour rester dans la bande spectrale d'émission de la luciférase in vivo. Ensuite, pour réduire les effets du bruit, l'image de la PSF obtenue est une moyenne de cent acquisitions. La Figure 4.3 montre un schéma simplifié du dispositif mis en œuvre pour relever la PSF et sur la Figure 4.4 est illustré un exemple de PSF acquise avec le système mis en œuvre.



**Figure 4.3 : Schéma du dispositif expérimental pour relever la réponse impulsionnelle du système.**



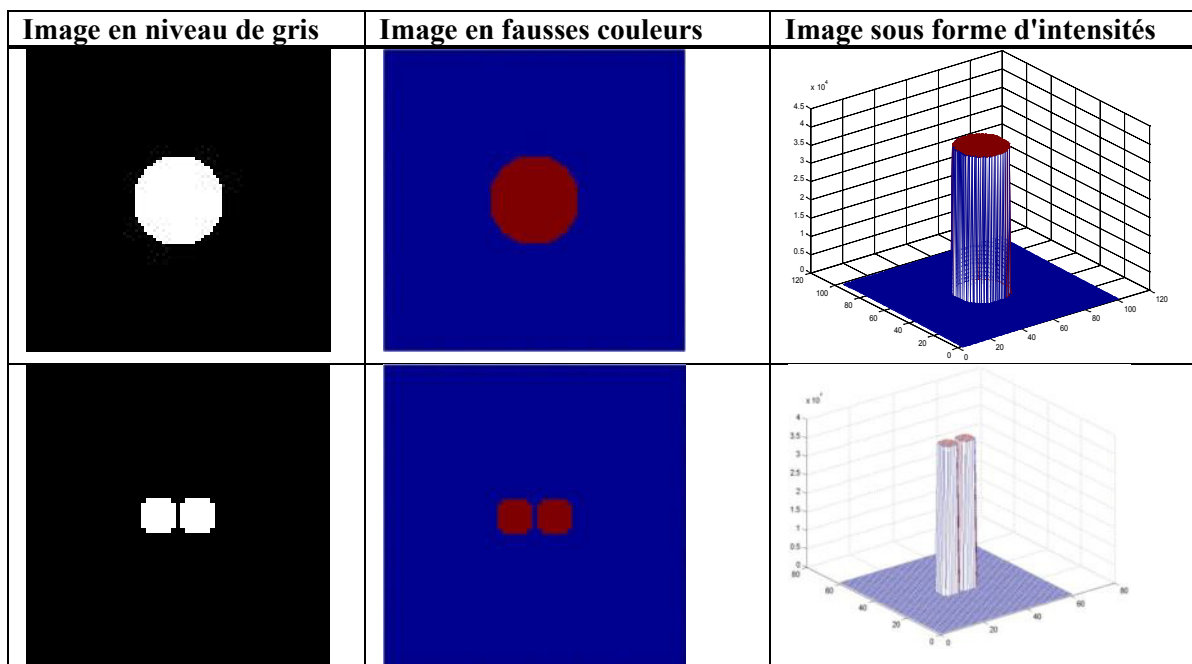
**Figure 4.4 : Zoom (40 x) sur l'image de la PSF relevée expérimentalement.**

#### **4.1.6 Génération des images de synthèse**

Pour tester et comparer les performances des algorithmes de déconvolution considérés en vue d'une application à l'imagerie de bioluminescence, nous avons généré des images de synthèse selon le modèle de dégradation que l'on a proposé pour la formation de ce type d'images dans le chapitre 2 (intégrant les imperfections du système d'acquisition). Chacune de ces images de synthèse est le résultat de la convolution entre l'image de synthèse originale des motifs non bruitée et de la PSF relevée expérimentalement. Après cette étape, l'image résultat est dégradée par un processus de Poisson pour tenir compte du phénomène lié à l'acquisition des photons. Puis, le bruit Gaussien du système relevé expérimentalement est ajouté à l'image résultante. Ces étapes permettent de tenir compte du système réel pour générer des images de synthèse sous les conditions de formation d'image de bioluminescence. Il est à noter que les images de synthèse générées sont codées sur 16 bits. Deux de ces images ont pour caractéristiques :

- ✚ La première image est formée d'un disque de rayon 2,25 mm avec une intensité des niveaux de gris uniforme de  $4 \cdot 10^4$ . Cette image permet de simuler une tumeur avec une émission de flux lumineux homogène sur toute sa surface.
- ✚ La seconde image est formée de deux petits disques proches de rayon 900  $\mu\text{m}$  séparés par 300  $\mu\text{m}$  avec une intensité des niveaux de gris uniforme de  $4 \cdot 10^4$ . Ces deux petits disques permettent quand à eux de simuler deux petites tumeurs proches.

Ces deux images de synthèse simulent respectivement une tumeur de taille moyenne et deux petites tumeurs proches. Les images sont codées sur 16 bits.



**Figure 4.5 : Illustration des deux images de synthèse utilisées pour la simulation de sources de bioluminescence.**

La Figure 4.6 montre les résultats intermédiaires obtenus pour chacune des étapes du processus de génération de la première image de synthèse (Disque) et sur la Figure 4.7 est reporté le résultat obtenu pour la deuxième image de synthèse.

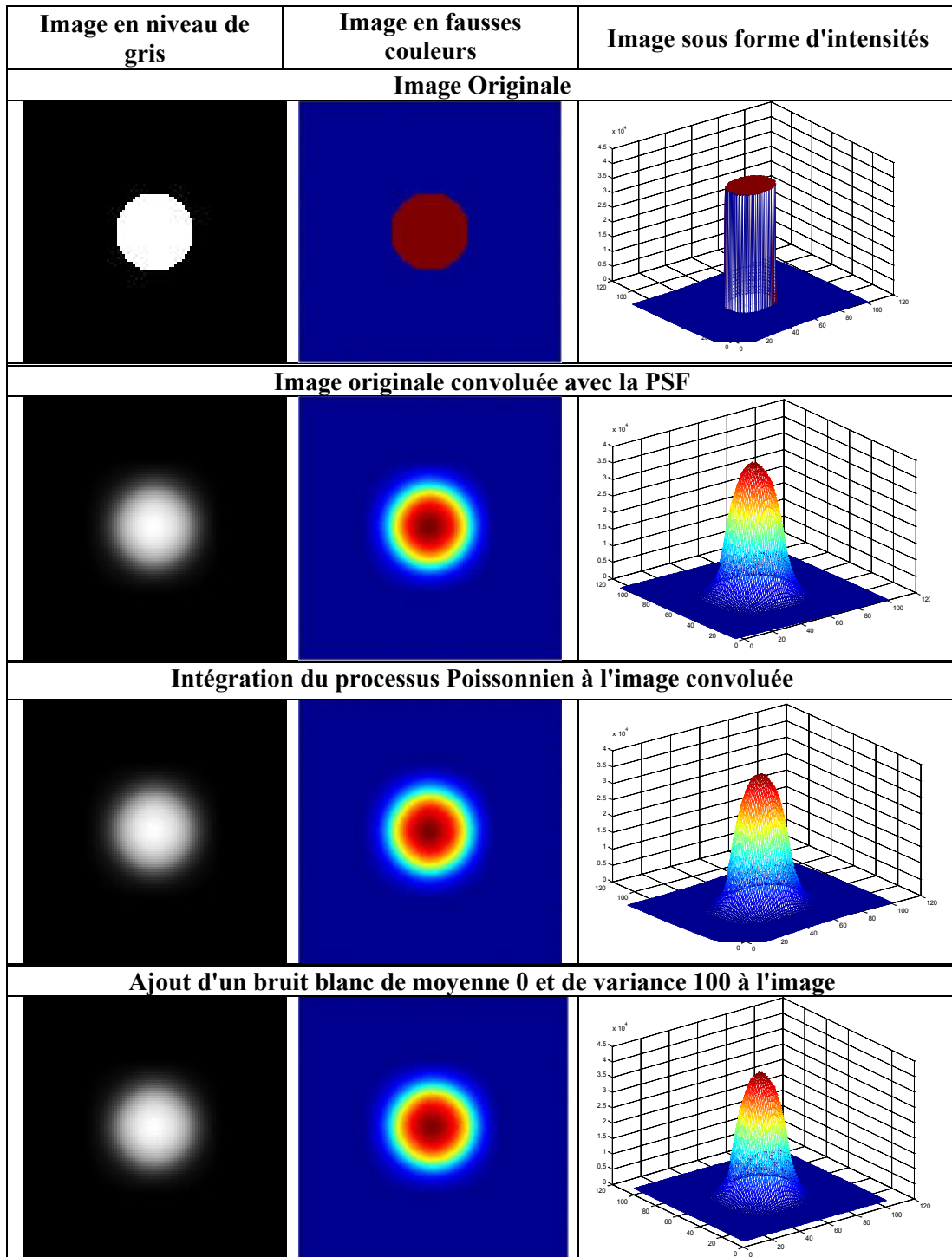
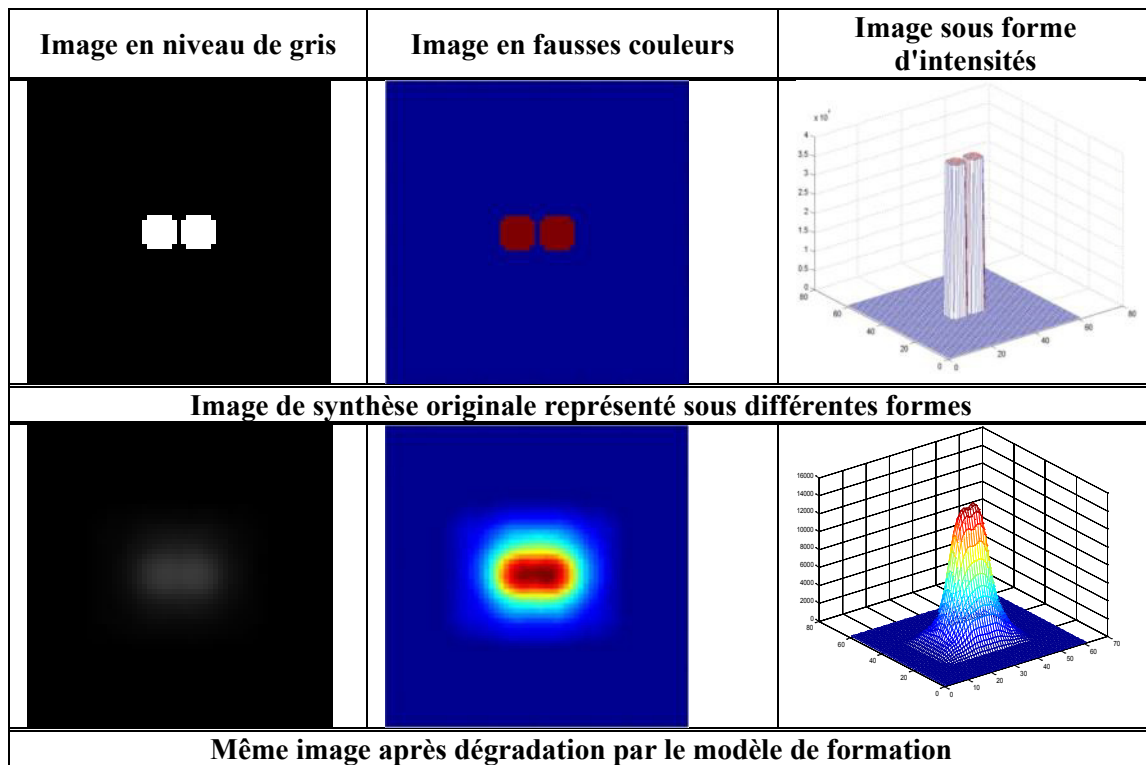


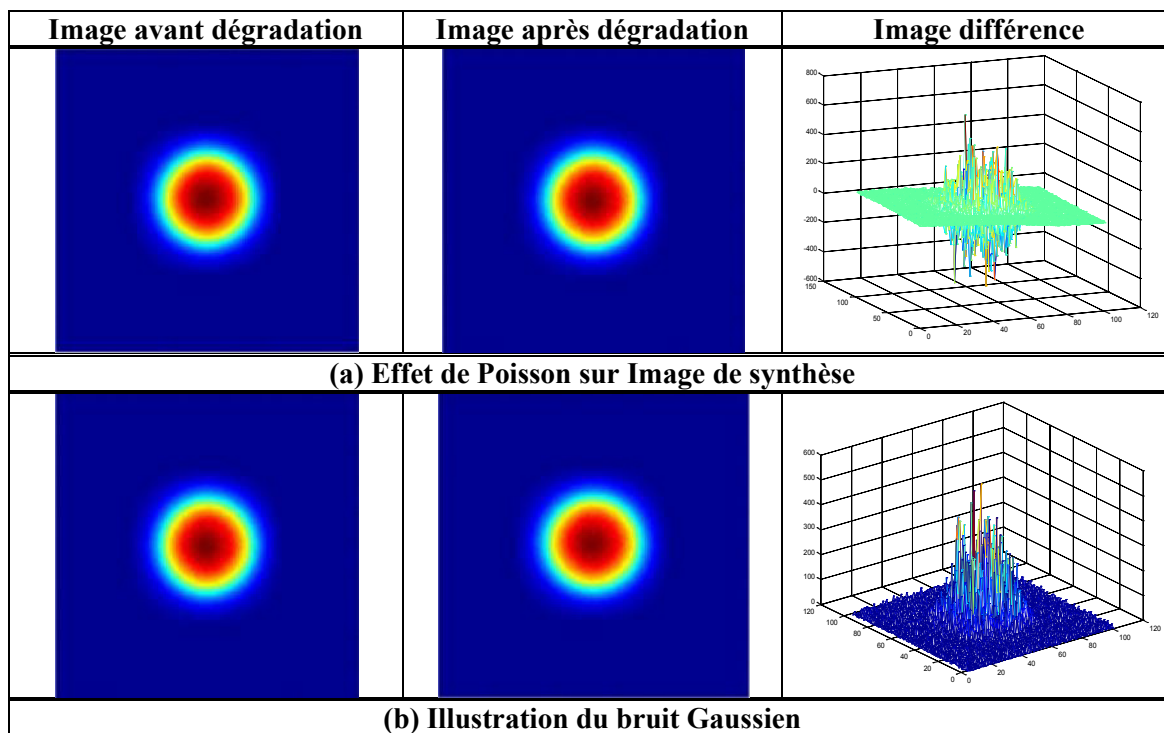
Figure 4.6 : Processus de génération d'une image de synthèse pour l'imagerie de bioluminescence.



**Figure 4.7 : Deuxième image de synthèse avant et après dégradation.**

Quand nous observons les résultats obtenus pour la première image de synthèse (Figure 4.6), nous constatons que visuellement il n'y a pas de différence notable entre l'image originale convoluée avec la PSF et cette même image après intégration du processus Poissonien. En revanche, si on observe le résultat de la différence entre les deux images avant et après intégration d'un processus Poissonien, la différence est mieux constatée et l'effet de Poisson est plus visible. Le résultat obtenu est reporté sur la Figure 4.8. Nous pouvons constater sur l'image différence que les niveaux de gris de l'image ont plus ou moins varié d'intensité ; il est à noter que l'effet est plus prononcé dans la zone la plus active (pixels avec des intensités de niveau de gris élevées) ce qui caractérise bien l'effet de Poisson.

Nous avons repris la même démarche pour mettre en évidence le bruit Gaussien ajouté à l'image de synthèse.



**Figure 4.8 : Illustration de l'effet de Poisson sur l'image de synthèse ainsi que l'ajout d'un bruit Gaussien.**

L'avantage de travailler avec des images de synthèse dégradées est que l'on connaît de manière précise l'objet initial et le modèle de dégradation appliqué à l'image. De ce fait, il est plus facile de quantifier la qualité des résultats obtenus en comparant l'image restaurée à l'image originale.

#### **4.1.7 Mise en œuvre de la comparaison de différents algorithmes de déconvolution**

Pour cette comparaison, nous avons considéré 11 algorithmes de déconvolution représentant les 5 classes de méthodes définies précédemment. Nous utiliserons les deux images de synthèse générées ainsi que la PSF déterminée expérimentalement.

##### **4.1.7.1 Rappel des différentes méthodes de déconvolution considérées**

Dans le tableau qui suit, sont résumées de manière algébrique les différentes méthodes de déconvolution étudiées et comparées pour la mise en œuvre de la déconvolution d'image de bioluminescence.

**Tableau 4.1 : Récapitulatif des différentes méthodes de déconvolution prises en compte dans cette étude comparative.**

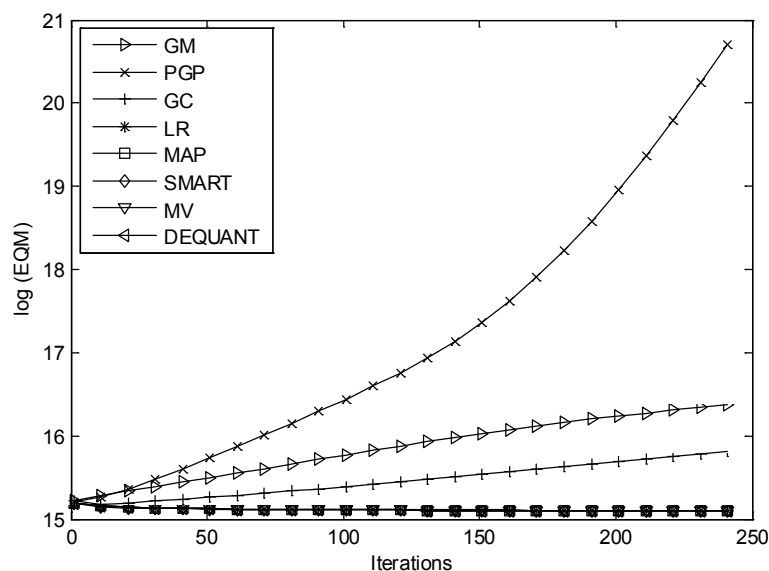
Technique	Formulation
Filtre inverse	$\hat{O}(x, y) = \frac{I(x, y)}{H(x, y)}$
Wiener	$\hat{O}(x, y) = I(x, y) \frac{H^*(x, y)}{H^*(x, y)H(x, y) + \frac{S_b^2(x, y)}{S_o^2(x, y)}}$
Tikhonov-Miller	$\hat{O}(x, y) = I(x, y) \frac{H^*(x, y)}{H^*(x, y)H(x, y) + \lambda C^*(x, y)C(x, y)}$
Golden- Meinel (GM)	$O_{n+1}(x, y) = O_n(x, y) \left[ \frac{I(x, y)}{(h * O_n)(x, y)} \right]$
Plus grande pente (PGP)	$O_{n+1}(x, y) = O_n(x, y) + \frac{\ r^n\ ^2}{r^n H r^n}$ Avec $r^n$ le résidu à la $n^{\text{ème}}$ itération.
Le Gradient conjugué (GC)	$O_{n+1}(x, y) = r_{n+1} + \xi_{n+1} O_n(x, y), \text{ avec } \xi_{n+1} = \frac{\ r_{n+1}\ ^2}{\ r_n\ ^2}$
Lucy-Richardson	$O_{n+1}(x, y) = \left[ \frac{I(x, y)}{(h * O_n)(x, y)} * h(-x, -y) \right] \cdot O_n(x, y)$
Maximum a posteriori	$O_{n+1}(x, y) = O_n(x, y) \exp\left[\left(\frac{I(x, y)}{(h * O_n)(x, y)} - 1\right) * h(-x, -y)\right]$
Simultaneous Multiplicative Algebraic Restoration (SMART)	$O_{n+1}(x, y) = O_n(x, y) \exp\left[h(x, y) * \frac{I(x, y)}{h(x, y) (h * O_n)(x, y)}\right]$
DeQuant	$O_{n+1}(x, y) = O_n(x, y) \left[ \frac{Z_{n+1}}{(h * O_n)(x, y)} \right]$ Avec $Z_{n+1}$ l'image reconstruite après estimation du paramètre de Poisson.
Maximum de vraisemblance (Aveugle)	$O_{n+1}(x, y) = \left[ \frac{I(x, y)}{(h_n * O_n)(x, y)} * h_n(-x, -y) \right] \cdot O_n(x, y)$ $h_{n+1}(x, y) = \left[ \frac{I(x, y)}{(h * O_n)(x, y)} * O_n(-x, -y) \right] \cdot h_n(x, y)$

Les performances de ces algorithmes sont évaluées par une étude comparative et cela en utilisant les deux images de synthèses générées et les paramètres de comparaison présentés paragraphe § 4.1.4.



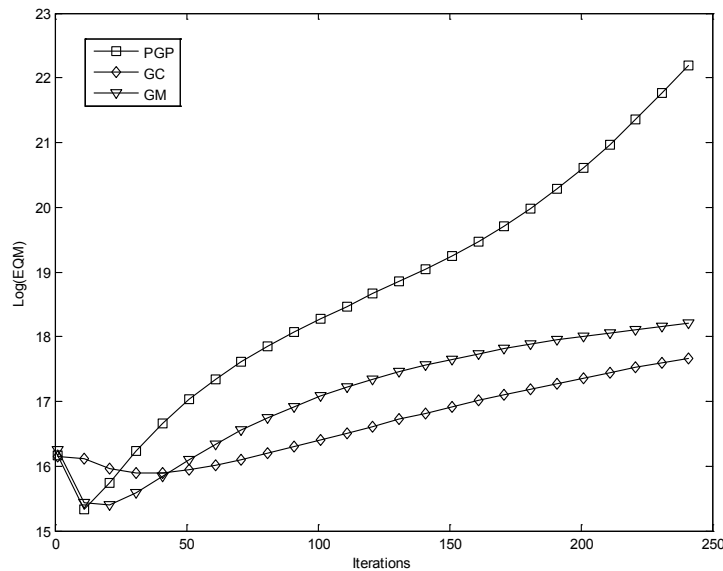
#### 4.1.8 Résultats obtenus en termes d'EQM

Pour quantifier la qualité de la restauration pour chacune des méthodes considérées, nous allons calculer l'EQM entre l'image après déconvolution et l'image originale (même image avant dégradation) et ceci pour chaque itération. Nous avons pris le soin de paramétrer chacune des méthodes de telle sorte à être optimum. Pour le filtre inverse, nous avons pris le soin d'éviter la division par zéro (fréquences nulles) qui limite grandement son efficacité, le choix de la valeur du rapport signal à bruit pour la méthode de Wiener a été fait après plusieurs essais pour prendre la meilleure valeur. C'est aussi le cas pour le paramètre lambda de la méthode de Tikhonov-Miller dont la valeur a été soigneusement choisie. La méthode basée ondelette requiert le choix d'une multitude de paramètres, ce choix de paramètres a fait l'objet d'un sujet de Master 2 (Berkache '09a). Les autres méthodes considérées sont itératives et n'ont pas de paramètres à régler mise à part le nombre d'itérations. Ce dernier est très important car il faut arrêter les itérations à la convergence et non après. Là aussi nous avons pris le soin de prendre le meilleur résultat obtenu pour chacune des méthodes sachant que les méthodes non linéaires convergent plus vite que les autres méthodes. Les résultats obtenus pour ces méthodes itératives sont reportés sur la Figure 4.9.



**Figure 4.9 : Mesures de performance en termes d'EQM en fonction des itérations pour chacune des méthodes de restauration itératives considérées. GM : Golden Meinel, PGP : Plus Grande Pente, GC : Gradient Conjugué, LR : Lucy Richardson, MAP : Maximum a posteriori, SMART : Simultaneous Multiplicative Algebraic Restoration, MV : Maximum de vraisemblance (aveugle), DEQUANT.**

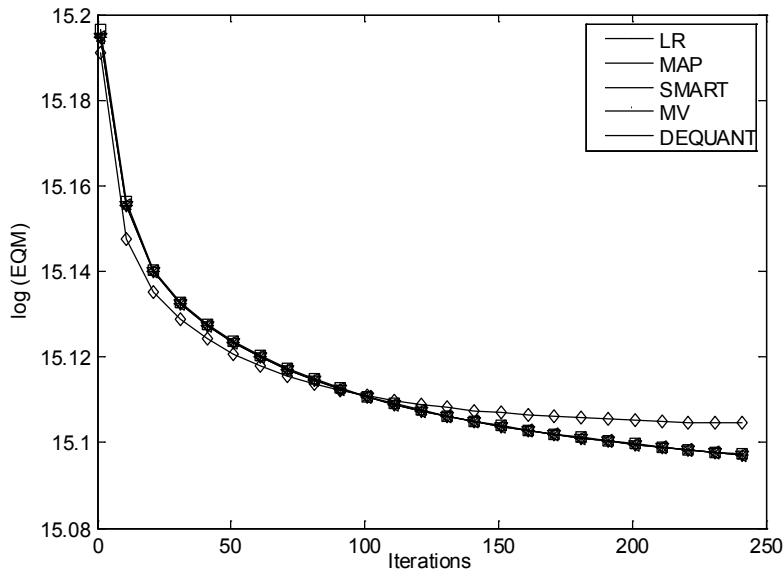
La première constatation est que les méthodes non linéaires divergent après quelques itérations ce qui fait que les courbes des autres méthodes s'entassent et sont moins lisibles. Cette divergence est due à la grande sensibilité de ces méthodes au bruit (Chomik '97), ce dernier est amplifié à chaque itération et finit par faire diverger les méthodes comme nous pouvons le constater sur Figure 4.10.



**Figure 4.10 : Courbes de performance en termes d'EQM en fonction des itérations pour les méthodes PGP, GM et GC.**

Alors, pour mieux mettre en évidence la convergence des méthodes statistiques, basées ondelettes et aveugle, nous avons repris la courbe de performance de l'EQM de la figure précédente et nous n'avons représenté que ces méthodes. Les courbes d'EQM obtenues sont reportées Figure 4.11. Nous pouvons maintenant constater que ces méthodes convergent au fur et à mesure des itérations. Il est à noter que les résultats sont équivalents pour toutes ces méthodes.

Pour une meilleure lecture et interprétation des résultats obtenus en termes d'EQM. Nous avons rapporté sur le Tableau 4.2 l'EQM minimum obtenu pour chacune des méthodes considérées.



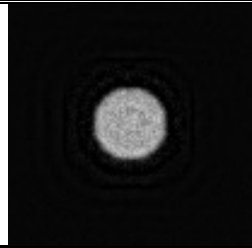
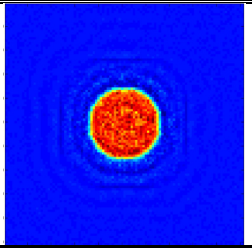
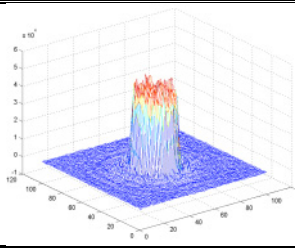
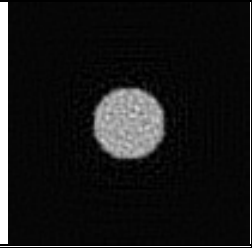
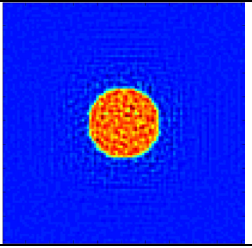
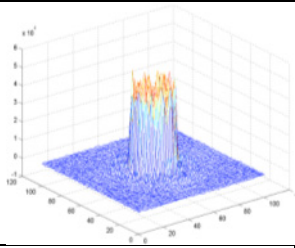
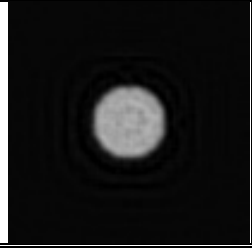
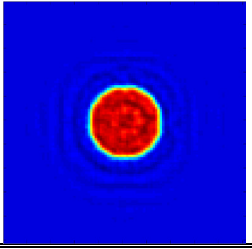
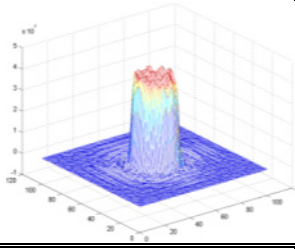
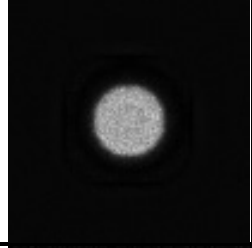
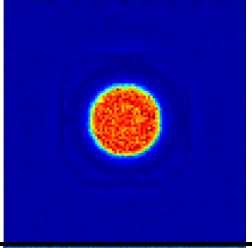
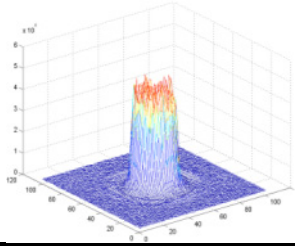
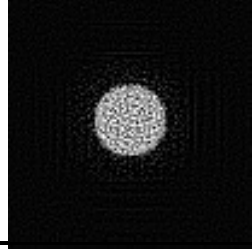
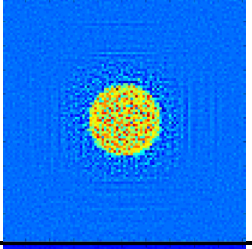
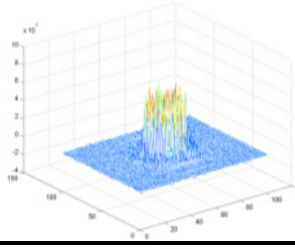
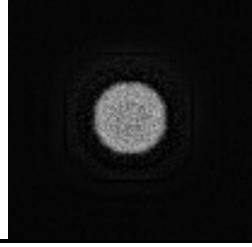
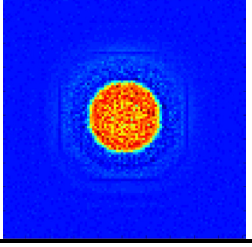
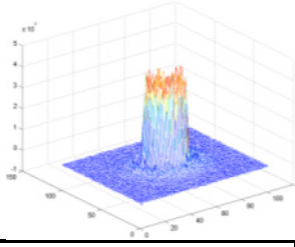
**Figure 4.11 : Courbes de performance en termes d'EQM en fonction des itérations pour les méthodes statistiques, basées ondelettes et aveugles.**

**Tableau 4.2 : EQM minimal obtenu pour chacune des méthodes considérées. FI : Filtre Inverse, W : Wiener, TM : Tikhonov Miller, GM : Golden Meinel, PGP : Plus Grande Pente, GC : Gradient Conjugué, LR : Lucy Richardson, MAP : Maximum a posteriori, SMART : Simultaneous Multiplicative Algebraic Restoration, MV : Maximum de vraisemblance, DEQUANT.**

	Méthodes linéaires			Méthodes non linéaires			Méthodes statistiques			Méthodes aveugles	Méthodes basées ondelette
	FI	W	TM	GM	PGP	GC	LR	MAP	SMART	MV	DEQUANT
<b>EQM (10<sup>6</sup>)</b>	7,31	5,48	5,25	5,34	6,66	4,22	3,60	3,62	3,65	3,60	3,63
<b>N° Itérations</b>	-	-	-	20	50	50	250	250	250	250	250

Dans ce qui suit, nous reportons sur les tableaux 4.3 et 4.4, les images résultats obtenues pour chacune des méthodes considérées, et dans la limite d'un nombre d'itération maximum de 250. Ces images résultats sont représentées qu'en niveau de gris ainsi en fausses couleurs et sous forme d'intensités pour mieux apprécier la restauration.

**Tableau 4.3 : Résultat de la restauration obtenue pour la première image de synthèse par les différentes méthodes.**

Méthodes	Image restaurée	Image en fausses couleurs	Image sous forme d'intensités
<b>Linéaires</b>			
Filtrage inverse			
Wiener			
Tikhonov Miller			
<b>Non linéaires</b>			
Golden Meinel			
Descente de gradient			
Gradient conjugué			
<b>Statistique</b>			


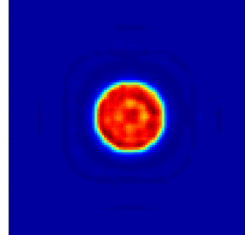
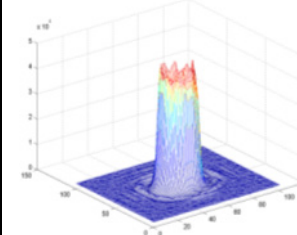

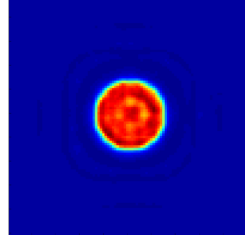
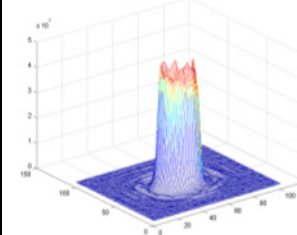

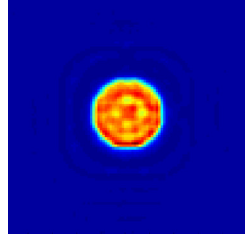
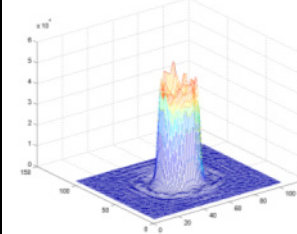

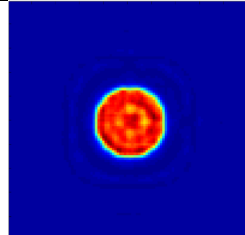
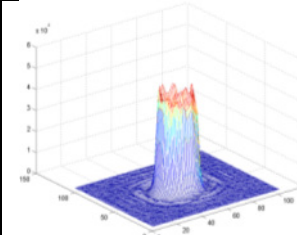

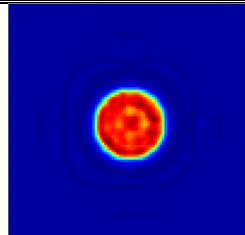
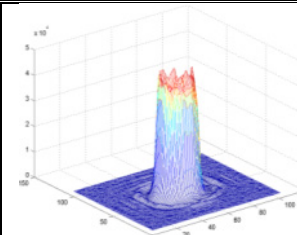
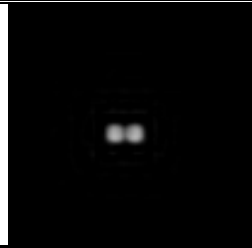
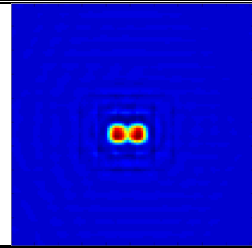
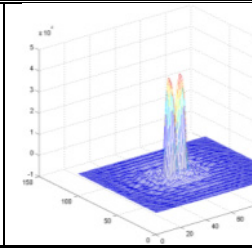
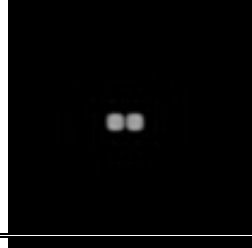
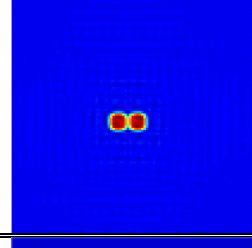
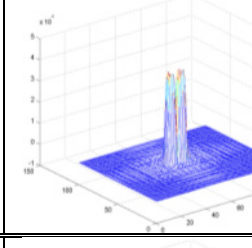
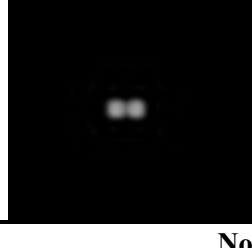
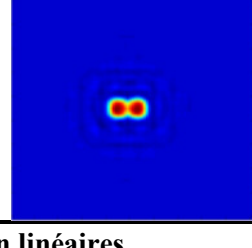
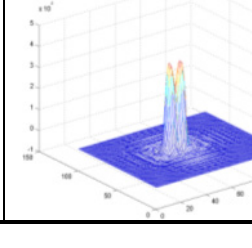
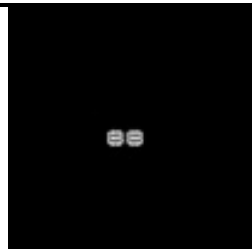
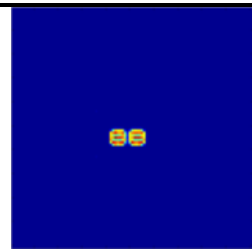
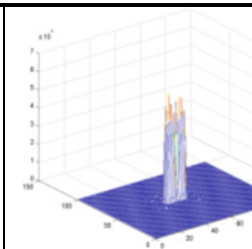
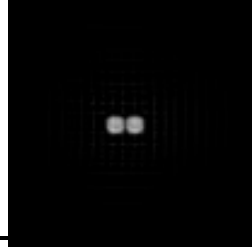
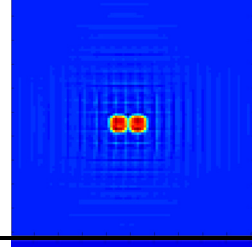
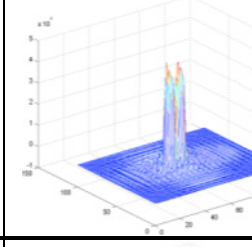
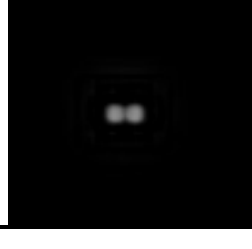
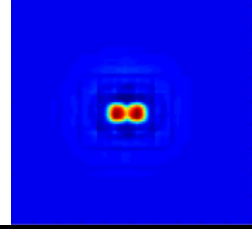
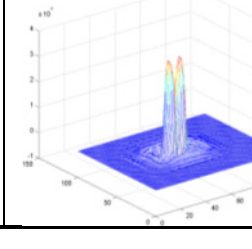
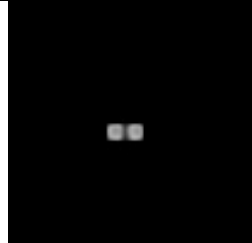
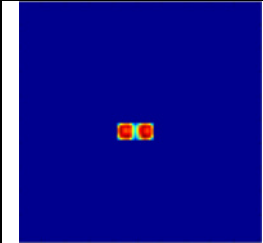
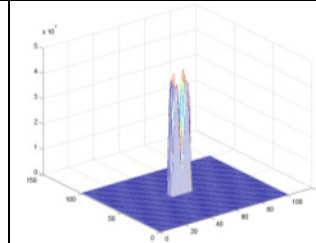
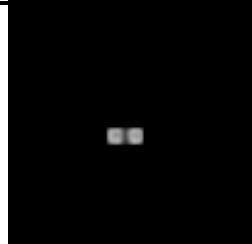
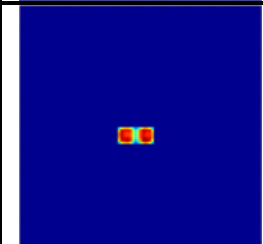
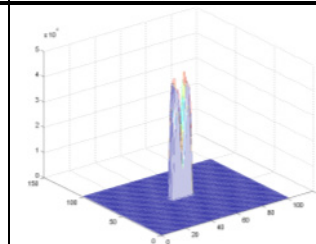
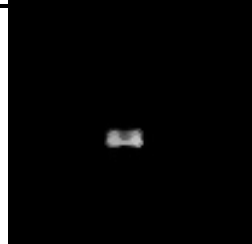
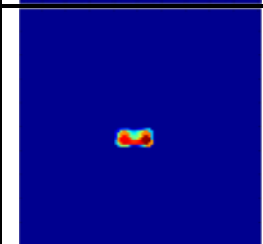
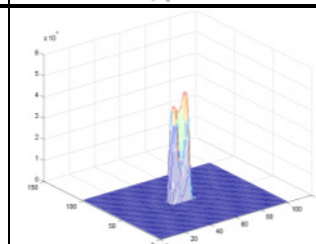
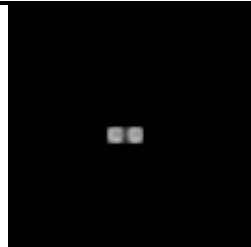
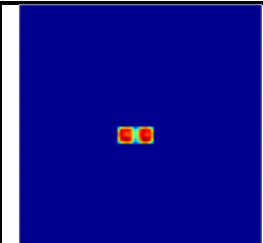
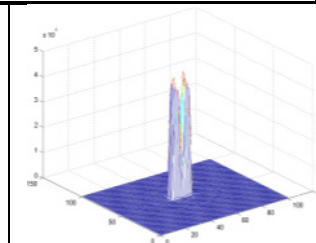
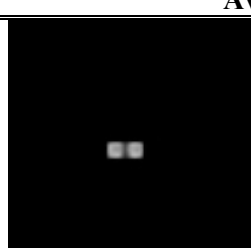
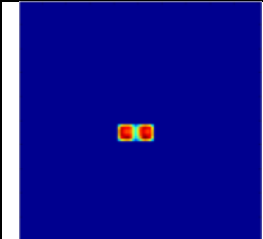
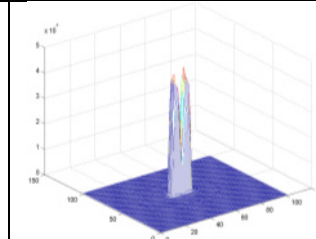
Lucy Richardson			
Maximum a posteriori			
Simultaneous multiplicative Algebraic restoration			
<b>basées ondelettes</b>			
Dequant			
<b>Aveugle</b>			
Déconvolution aveugle			

Tableau 4.4 : Résultat de la restauration obtenue pour la deuxième image de synthèse par les différentes méthodes.

Méthodes	Image restaurée	Image en fausses en fausses couleurs	Image sous forme d'intensités
<b>Linéaires</b>			
Filtrage inverse			
Wiener			
Tikhonov Miller			
<b>Non linéaires</b>			
Golden Meinel			
Descente de gradient			
Gradient conjugué			
<b>Statistique</b>			

Lucy richardson			
Maximum a posteriori			
Simultaneous multiplicative Algebraic restoration			
<b>Basées ondelettes</b>			
Dequant			
<b>Aveugle</b>			
Déconvolution aveugle			

#### 4.1.9 Discussion des résultats obtenus en termes d'EQM

Les résultats obtenus en termes d'EQM montrent que ce sont les méthodes statistiques, celles basées ondelettes et aveugles qui donnent les meilleurs résultats. Ce constat est logique car ces méthodes prennent en compte le fait que le modèle de formation de ces images est un modèle de Poisson ce qui n'est pas le cas des autres méthodes qui sont soit basées sur une simple inversion (très sensible au bruit) ou basées sur un modèle Gaussien de formation d'image. Enfin, le résultat visuel de la déconvolution par les méthodes statistiques, la méthode

basée ondelettes et la méthode aveugle montrent que l'on retrouve bien la forme initiale de la première image de synthèse et la résolution spatiale est bien restaurée. C'est aussi le cas de la deuxième image de synthèse ou les deux sources lumineuses initiales sont retrouvées sauf pour la méthode SMART qui n'arrive pas à séparer les deux sources.

L'EQM est un critère de comparaison global sur l'image et il est difficile alors d'en juger la qualité de restauration. Pour un EQM minimal il n'est pas sûr d'avoir le meilleur résultat de restauration d'une image. Comme l'attestent les résultats précédents.

Pour compléter notre étude et mieux juger de la qualité de la restauration de chacune des méthodes, nous allons mettre en œuvre un test comme celui de Mignotte (Mignotte et Meunier '00).

#### **4.1.10 Evaluation de la qualité de la restauration des intensités**

Cette évaluation a pour objectif de tester la capacité de chacune des méthodes à retrouver l'intensité lumineuse initiale. Cette possibilité s'avère intéressante en bioluminescence dans le but d'une mesure quantitative du flux lumineux émis qui serait proportionnelle à la quantité de gènes émissifs. A l'aide de la première image de synthèse représentant un disque qui simule une source de bioluminescence, nous avons quantifié l'intensité lumineuse moyenne restaurée sur une zone d'intérêt. Cette zone d'intérêt est délimitée par un cercle qui entoure la zone active comme représenté sur la figure située dans le Tableau 4.5. Sur cette même zone, nous avons aussi calculé l'écart type des intensités pour voir la variabilité du niveau de gris dans cette zone. Nous avons relevé l'intensité moyenne dans cette zone pour chaque itération ainsi que l'écart type correspondant. Ces deux grandeurs sont représentées respectivement sur les Figure 4.12 et Figure 4.13.



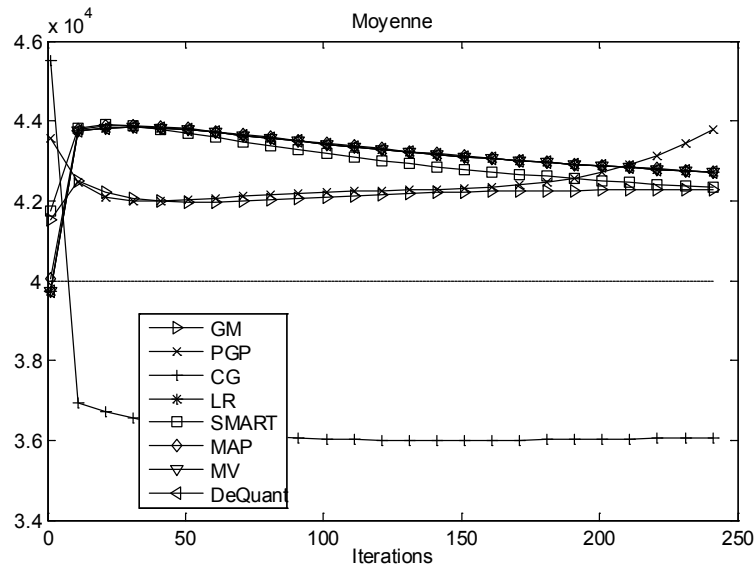


Figure 4.12 : Valeur moyenne des intensités de la région d'intérêt obtenues pour chaque itération

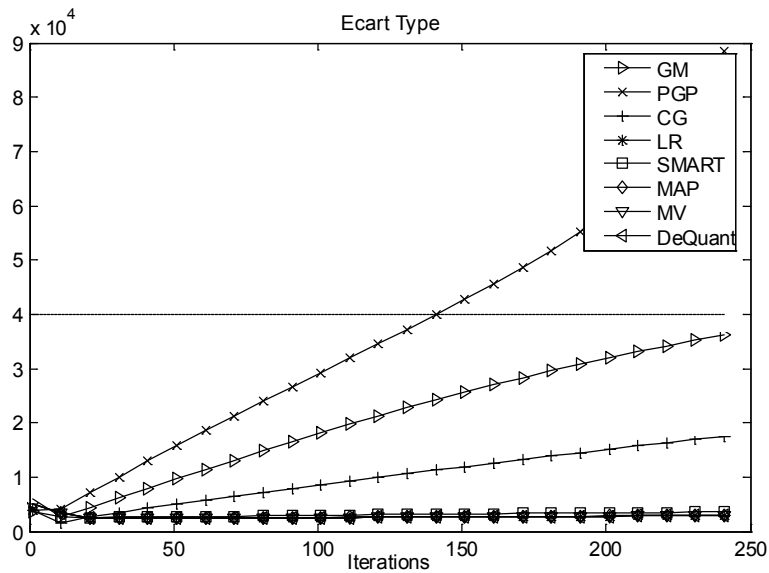
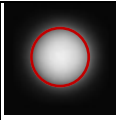


Figure 4.13 : Ecart type des intensités de la région d'intérêt obtenu pour chaque itération

Tableau 4.5 : Intensité moyenne ainsi que l'écart type correspondant obtenus pour chacune des méthodes dans la région d'intérêt choisie sur l'image de synthèse.

	Méthodes linéaires			Méthodes non linéaires			Méthodes statistiques			Méthodes aveugles	Méthodes basées ondelettes
	FI	W	TM	GM	PGP	GC	LR	MAP	SMART	MV	DEQUANT
Moyenne $10^4$	4,211	4,215	4 ,187	4,218	4,195	3,67	4,209	4,224	4.231	4,209	4,213
Ecart-Type $10^3$	18,84	12,54	7,47	4,57	6,49	17,19	3,53	3,54	4,32	2,53	3,45
N° Itérations	-	-	-	20	50	50	250	250	250	250	250

Les résultats obtenus en termes d'intensité moyenne (voir la Figure 4.12 et Figure 4.13) montrent que toutes les méthodes donnent des valeurs proche de la vraie valeur ( $40 \cdot 10^3$ ) avec une légère surestimation de l'intensité moyenne sauf pour la méthode du gradient conjugué qui donne une valeur d'intensité moyenne inférieure à la valeur réelle. Les résultats en termes d'écart type confirment ceux obtenus pour l'EQM à savoir que les méthodes statistiques et celles basées ondelettes et aveugle donnent les meilleurs résultats (voir Tableau 4.5) car l'écart type est minimum pour ces méthodes avec un avantage pour la méthode aveugle. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette méthode réestime la PSF à chaque itération. Ce qui permet une meilleure convergence vers la solution. La méthode basée ondelette présente aussi un léger avantage par rapport aux méthodes statistiques, en effet cette méthode filtre le bruit de Poisson à l'aide d'un test statistique avant de réaliser la déconvolution proprement dite. Mais l'apport de cette méthode reste minime devant sa complexité de paramétrisation et son temps d'exécution prohibitif.

#### **4.1.10.1 Conclusion**

Cette étude comparative nous a permis au vu des résultats obtenus par les différentes méthodes de déconvolution de conclure que la méthode de déconvolution aveugle est celle qui présente les meilleurs caractéristiques. Elle permet à la fois une bonne restauration de la forme des objets contenus dans l'image et une amélioration de la résolution spatiale. Elle permet aussi une bonne restauration des intensités contenues initialement dans l'image avant dégradation avec un taux d'erreur minimal ce qui permettra une bonne quantification.

#### **4.1.10.2 Critère d'arrêt**

Les méthodes de déconvolution itératives que nous avons considéré donnent à chaque itération une estimée  $\hat{O}$  de la solution. Pour stopper l'itération de ces méthodes, il est possible soit de se fixer un nombre maximum d'itérations ou de poursuivre les itérations jusqu'à ce que l'algorithme de déconvolution trouve une fonctionnelle optimum. En pratique, cette option n'est pas recommandée car l'expérience a montré que l'estimée de la vraisemblance de Lucy-Richardson augmente de façon logarithmique en fonction du nombre d'itérations. Pour cette raison, la recherche du maximum de vraisemblance de la fonction a un coût calculatoire très élevé. De ce fait, pour stopper les itérations, nous utilisons la différence entre deux itérations successives, qui est défini comme suit :

$$\frac{\sum_{i,j} |O_{n+1} - O_n|}{\sum_{i,j} O_n} < t \quad (4.18)$$

Si la différence est inférieure à  $t$  les itérations sont stoppées, typiquement nous choisissons des valeurs de  $t$  comprises entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  ; cela dépend de la précision désirée. Ce critère peut être vu comme un critère de rapidité de convergence puisque c'est un seuil qui représente le changement de la pente de la fonctionnelle en fonction des itérations.

## 4.2 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons fait une étude comparative de onze méthodes de déconvolution. Ces méthodes, nous les avons classées en cinq classes à savoir les méthodes linéaires, non linéaires, statistiques, basées ondelettes et aveugles. Nous avons généré des images de synthèse à l'aide du modèle de formation des images de bioluminescence que nous avons défini dans le chapitre 2. A partir des résultats obtenus et à l'aide des critères de comparaison utilisés, nous avons montré que c'est la méthode aveugle qui donne les meilleurs résultats de restauration pour les images de bioluminescence en termes d'EQM et de restauration des intensités lumineuses. Ceci s'explique en grande partie par le fait que cette méthode est moins sensible aux incertitudes sur la PSF utilisée car cette dernière est réestimée au fil des itérations. Le deuxième bloc de notre chaîne de traitement des images de bioluminescence est ainsi défini.

Troisième partie :

## **Résultats**

## 5 Validation

***Résumé :** Dans ce chapitre, nous allons valider la chaîne de traitement proposée sur des images de bioluminescence réelles. Comme notre chaîne de traitement est composée de deux parties (filtrage et déconvolution), dans un premier temps, nous allons valider la partie filtrage sur des images de bioluminescence entachées de bruit cosmique. Par la suite, nous allons valider la partie déconvolution à partir d'un ensemble d'images de souris présentant des tumeurs sous cutanées. Nous allons confronter les résultats de mesures dimensionnelles relevées sur les images de bioluminescence avant et après restauration à des mesures faites in situ par mesure sur des images macroscopiques prises avec un appareil photo numérique.*

### 5.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous allons mener des études terrain de manière à valider les deux parties de la chaîne de traitement d'images proposée. Pour cela, en collaboration avec notre partenaire (CIPA) (Centre d'Imagerie du Petit Animal) du CNRS d'Orléans, plusieurs expérimentations sur différents lots de souris porteuses de cellules cancéreuses génétiquement modifiées ont été conduites. Nous pouvons scinder ces différentes expérimentations en trois grandes parties ; il s'agit d'une part, de tester la capacité du filtre ASWM à éliminer de manière efficace le bruit lié aux rayons cosmiques et d'autre part de voir dans quelle mesure la partie déconvolution permet de corriger l'effet de diffusion des tissus que subit le signal lumineux issu des sources bioluminescentes. Enfin nous montrons au travers d'exemples

d'acquisitions, l'apport de la chaîne en ce qui concerne la séparation de sources bioluminescentes très proches.

Dans ce qui suit, nous allons présenter les caractéristiques du système d'acquisition et le protocole suivi pour l'acquisition de ces images ensuite nous allons voir la validation de la chaîne.

## **5.2 Système et protocole d'acquisition d'images de bioluminescence**

### **5.2.1 Système d'acquisition**

Nous disposons d'un système commercialisé par la société Hamamatsu, (Macroscopic Imaging AEQUORIA) pour faire nos acquisitions d'images de bioluminescence; la Figure 5.1 montre une photo de ce dernier.



**Figure 5.1 : Image du système d'acquisition Hamamatsu (Macroscopic Imaging AEQUORIA system).**

Ce système se compose d'un boîtier hermétique équipé d'une camera CCD refroidie à  $-70^{\circ}\text{C}$  travaillant dans la gamme spectrale de la luciférase in vivo. La camera CCD est fixée au dessus du boîtier. Ce dernier est muni à l'intérieur d'un plateau amovible pour accueillir l'animal à imager. Il est à noter qu'il est possible d'imager plusieurs animaux simultanément. Les images obtenues ont une résolution de  $512 \times 512$  pixels et elles sont codées sur 16 bits. La résolution spatiale est de  $300 \mu\text{m}$  par pixel. La fiche caractéristique de ce système fournie par le constructeur est présentée en Annexe B.

Nos expérimentations sont menées sur des lots de souris porteuses de tumeurs. Ces tumeurs ont la faculté d'émettre de la lumière en présence de luciférine car composées de

cellules génétiquement modifiées intégrant le gène de la luciférase. L'acquisition des images de bioluminescence est menée selon un protocole qui tient compte du temps de latence entre la préparation de l'animal, l'injection du substrat (luciférine) à ce dernier et l'émission optimale de la lumière par les sources bioluminescentes. Ce protocole étant commun à toutes acquisitions d'images de bioluminescence, nous le présentons en détails dans ce le paragraphe qui suit.

### **5.2.2 Protocole expérimental**

La première étape de ce protocole consiste à anesthésier la souris à imager pour supprimer ses mouvements lors de l'acquisition. Après un délai de 10 minutes, il lui est injecté une dose de luciférine. Elle est ensuite positionnée sur un plateau et fixée de manière à être solidaire de ce dernier. Le plateau est ensuite inséré dans le boîtier hermétique du système d'acquisition. Deux acquisitions sont réalisées grâce au système. La première consiste en une photo prise dans le domaine du visible (avec éclairage). L'autre acquisition est celle de bioluminescence proprement dite. Comme toute acquisition de ce type (imagerie fonctionnelle), il est nécessaire d'avoir un temps d'intégration approprié; cela va dépendre de la quantité de lumière émise, cette quantité de lumière est directement liée au volume de la tumeur et donc au nombre de cellules émettrices (Rehemtulla et al. '00; Edinger et al. '02). Typiquement l'émission est de 5 à 100 photons/seconde/cellule pour  $4\pi$  stéradians (Rice et al. '01). Cela dépend du type de cellules tumorales utilisées. Il est ensuite possible de superposer ces deux acquisitions pour situer les sources bioluminescentes sur le corps de l'animal.

## **5.3 Validation de la chaîne**

La validation de la chaîne proposée est faite sur des images de bioluminescence réelles; ces images sont fournies par le CIPA qui met à la fois à notre disposition des modèles murins porteurs de différents modèles tumoraux et le système d'acquisition des images.

### **5.3.1 Validation du filtre**

Cette première expérimentation a pour but le test et la validation du filtre ASWM mis au point pour l'élimination du bruit cosmique. Ce bruit parasite présent lors de l'acquisition des images de bioluminescence est notamment gênant quand le signal bioluminescent est très faible. La validation du filtre est faite sur des images de bioluminescence acquises sur un lot

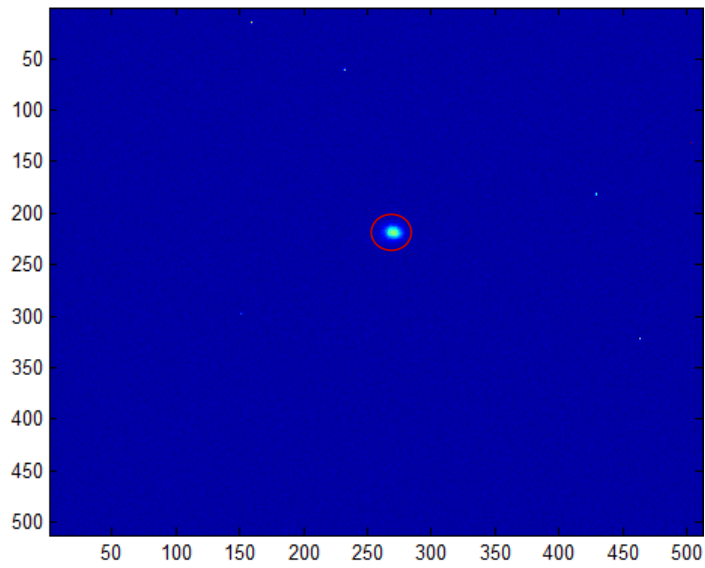
de souris mis à notre disposition par le CIPA. Ces souris ont développé des petites tumeurs sous cutanées. Du fait que ces tumeurs sont petites, les images acquises ont la particularité d'avoir un signal bioluminescent très faible et un fort bruit impulsionnel. Comme on peut le constater sur l'image (a) de la Figure 5.2, le signal de bioluminescence étant repéré par un cercle rouge, les autres points lumineux qui apparaissent sur l'image sont dus aux rayons cosmiques. L'effet gênant de ce bruit est plus évident quand l'image est affichée sous forme d'intensités Figure 5.2 (b). Le niveau du bruit est du même ordre que le signal de bioluminescence voire plus important.

Les résultats obtenus montrent qu'après application du filtre ASWM sur le lot d'images acquises, les images ne contiennent plus que le signal utile. Le résultat sur un échantillon de trois images est reporté sur les figures 5.2 à 5.4. Pour chacun des trois exemples, nous présentons l'image acquise en fausses couleurs, cette même image sous forme d'intensités et enfin l'image obtenue après filtrage avec ASWM.

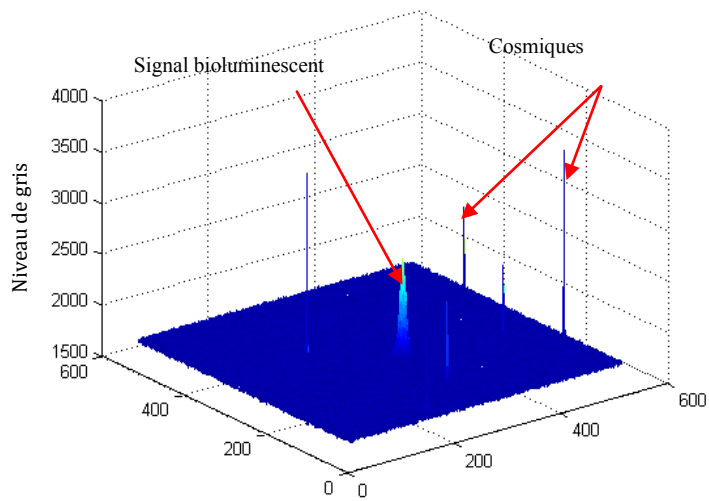
Le filtre ASWM proposé donne de très bons résultats en ce sens qu'il filtre de manière efficace le bruit cosmique présent dans les images de bioluminescence sans que le signal de bioluminescence soit affecté. On peut le constater sur les trois images figures 5.2 à 5.4.

La partie filtrage de notre chaîne étant validée, nous allons dans ce qui suit nous intéresser à la partie déconvolution. Pour cela, les images de bioluminescence sont dans un premier temps filtrées avec le filtre ASWM, puis on leur applique l'algorithme de déconvolution choisi dans la partie II. Donc, il s'agit à la fois d'une validation de l'étape de déconvolution mais aussi de toute la chaîne de traitement proposée.

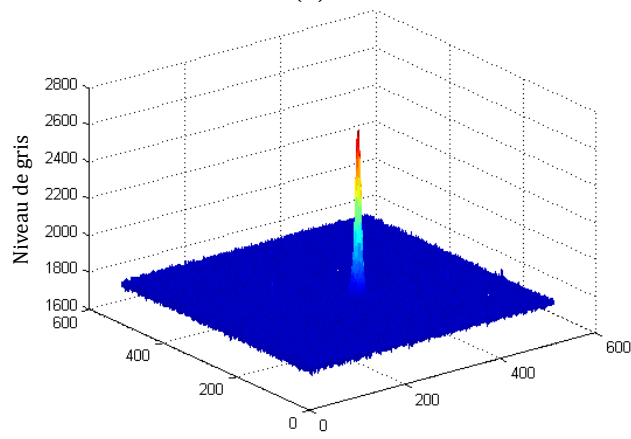




(a)



(b)



(c)

Figure 5.2 : Exemple 1 d'image de bioluminescence (a) image en fausses couleurs, (b) même image sous forme d'intensités (c) image obtenue avec le filtre ASWM.

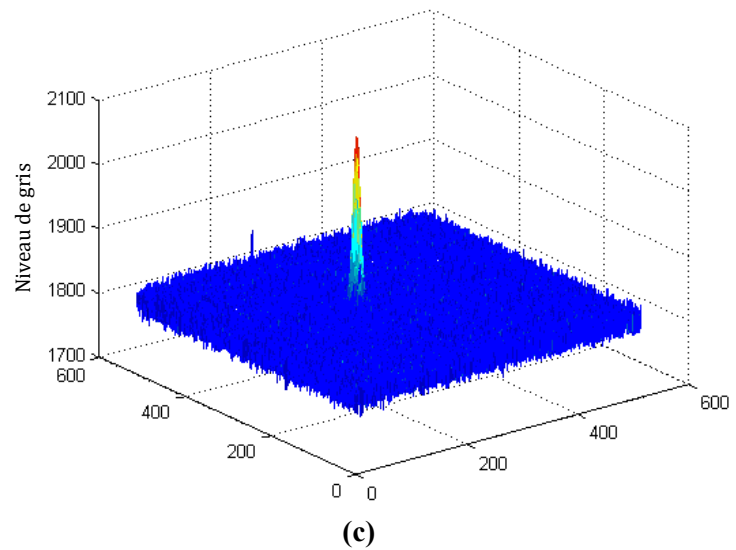
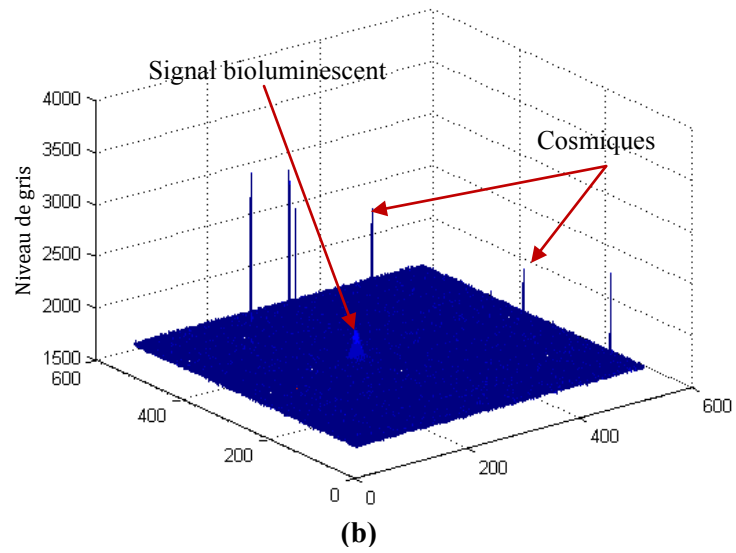
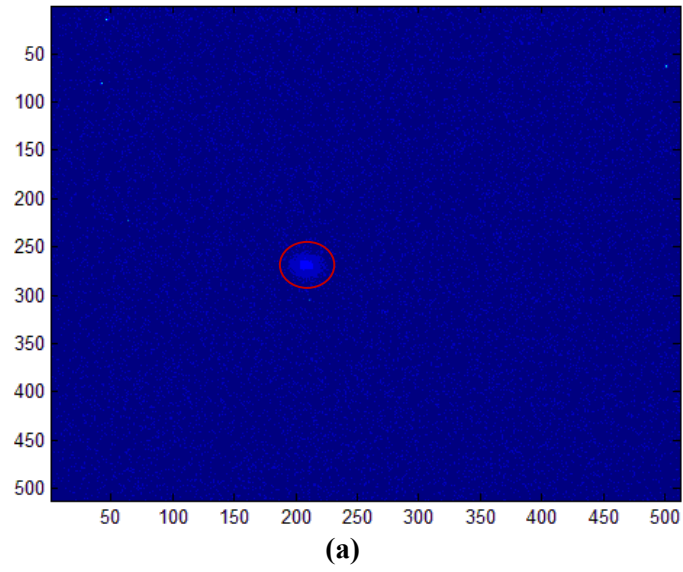


Figure 5.3 : Exemple 2 d'image de bioluminescence (a) image en fausses couleurs, (b) même image sous forme d'intensités (c) image obtenue avec le filtre ASWM.

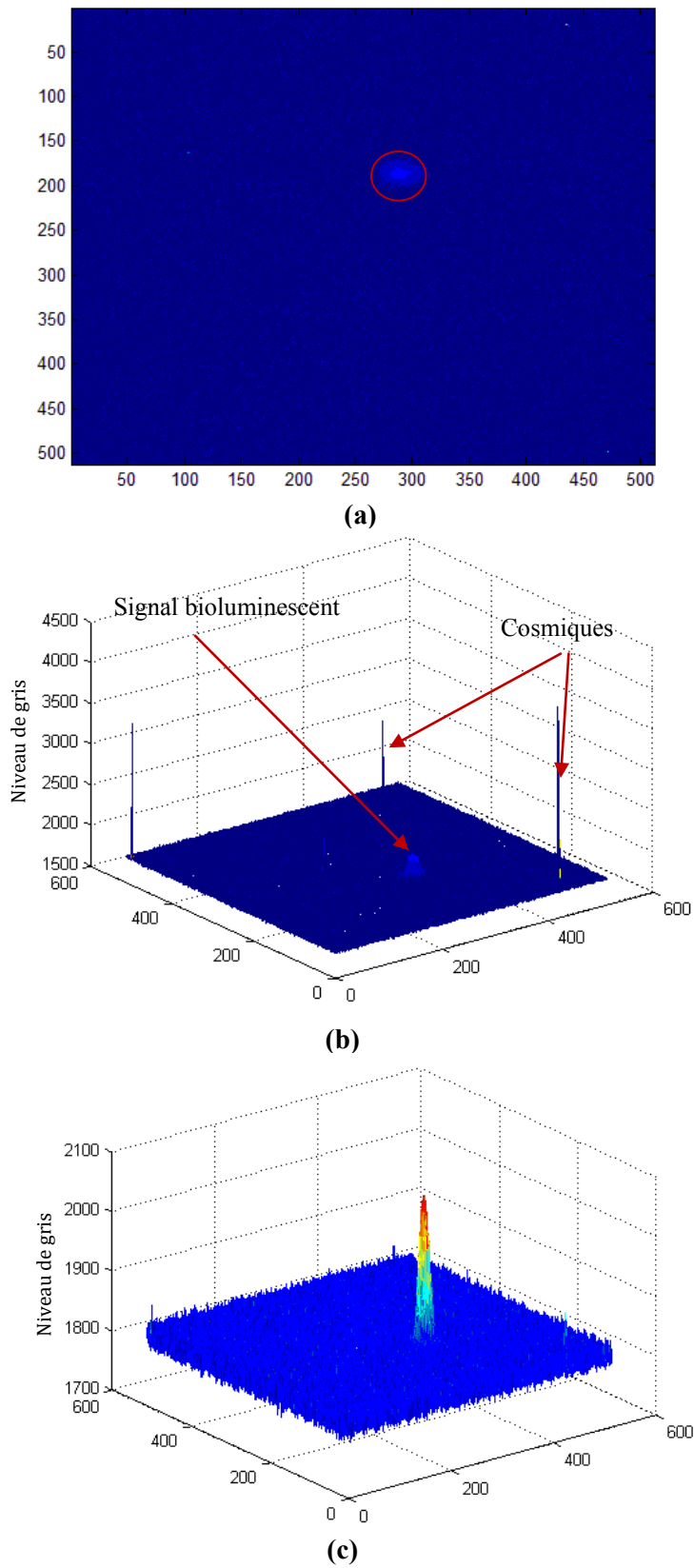


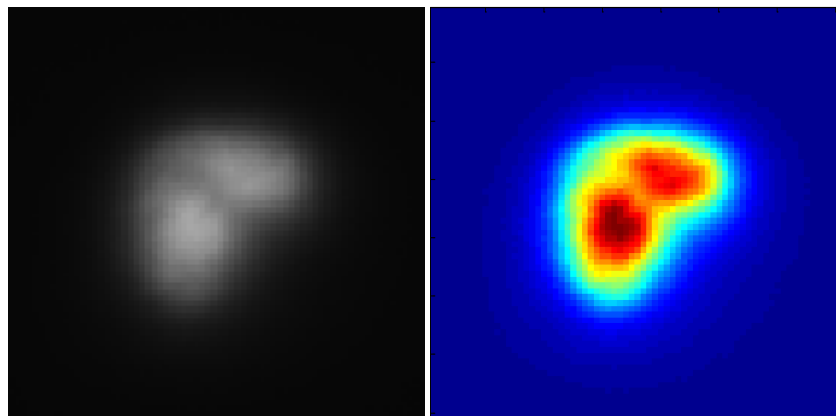
Figure 5.4 : Exemple 3 d'image de bioluminescence (a) image en fausses couleurs, (b) même image sous forme d'intensités (c) image obtenue avec le filtre ASWM.

### 5.3.2 Validation de la méthode de déconvolution retenue

Cette deuxième expérimentation a pour objectif de déterminer si la taille des tumeurs obtenue sur l'image de bioluminescence après application de notre algorithme de déconvolution correspond bien à la taille réelle des tumeurs relevées in situ ou sur des images macroscopiques. Des études ont montré que pour des tumeurs de petite taille (Diamètre < 10 mm) comme celles que nous étudions, le rayonnement volumique est homogène (Chia-Chi et al. '07; Zinn et al. '08). Il peut donc être envisagé de procéder à des mesures dimensionnelles sur les images de bioluminescence après traitement de ces dernières. Cela permettra une meilleure localisation des contours des sources tumorales et une bonne appréciation de leurs tailles et formes ainsi qu'une meilleure différenciation entre des sources qui pourraient être proches. Lors de cette expérimentation, nous allons faire des mesures dimensionnelles des tumeurs sous cutanées avant et après restauration ainsi qu'un relevé in situ avec un appareil photo numérique Canon 40D de 10 MégaPixels (3888\*2592). Cette appareil est équipé d'un objectif 18 - 200 mm réglé sur 150 auquel une bague allonge de 60 mm a été ajoutée afin d'augmenter le tirage de l'objectif d'origine (c'est-à-dire augmenter la distance qui sépare l'objectif du capteur). Ce système d'acquisition fournit des images des tumeurs de très bonne résolution (1 pixel = 7 $\mu$ m). Il est donc possible de mesurer précisément leurs dimensions de manière numérique.

Pour la mise en œuvre de cette expérimentation animale, nous disposons d'un lot de sept souris. A l'âge de douze semaines, on leur a inoculé des cellules tumorales au niveau du flanc droit. Le modèle de tumeur choisi présente l'avantage d'être bien distinct des tissus avoisinant et de prendre une forme sphérique qui aura moins tendance à s'étaler. Les images de bioluminescence ont été réalisées 1 mois après la prolifération de la tumeur. Le protocole d'acquisition reste le même qu'avant, l'acquisition de l'image de bioluminescence est effectuée avec une durée d'exposition de 20 secondes. A l'issue de cette acquisition, le plateau est ressorti du système d'acquisition et une incision est réalisée sur la peau de la souris au niveau de la tumeur de manière à rendre visible cette dernière. Une photo est réalisée grâce à l'appareil photo numérique. Sur cette dernière la taille de la tumeur est calculée en déterminant le nombre de pixels constituant la tumeur en largeur et en hauteur puis en multipliant ces deux nombres par la taille d'un pixel (c'est-à-dire 7 $\mu$ m).


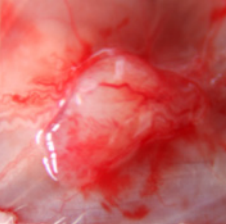
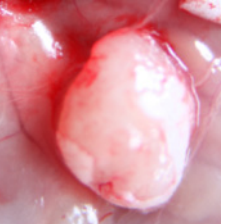

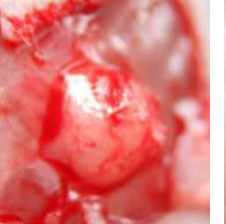




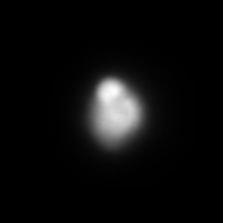
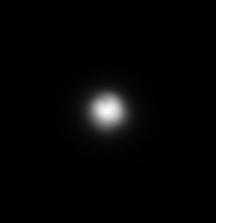
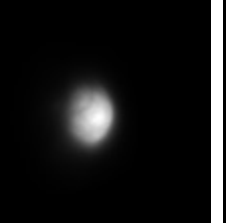
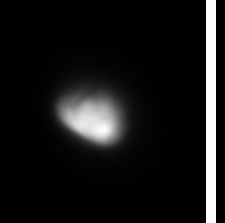

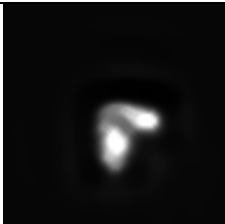

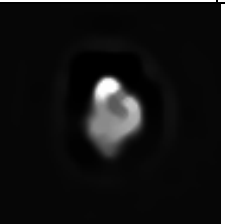
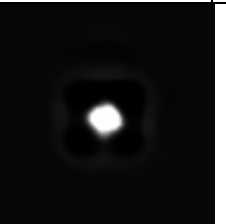

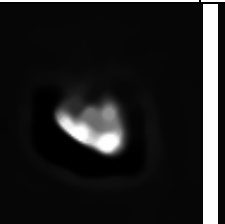

La Figure 5.5 montre un foyer bioluminescent en niveau de gris puis en fausses couleurs.



**Figure 5.5 : Image de bioluminescence en niveau de gris, même image en fausses couleurs.**

Nous avons reporté sur le tableau 5.1, les images macro des tumeurs après ablation de la peau, les images de bioluminescence acquises et les images de bioluminescence obtenues après déconvolution. Notez que les images macros ne sont pas à la même échelle que les acquisitions de bioluminescence.

**Tableau 5.1 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la restauration du lot de sept images de bioluminescence, (a) Image dans le visible de la tumeur après ablation de la peau (b) Image de bioluminescence de la tumeur, (c) même image de bioluminescence après filtrage et déconvolution.**

	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Souris 6	Souris 7
(a) Image macro							
(b) Image Bio							
(c) Image Bio restaurée							

Avec les outils classiques de localisation de contours, nous avons mené une mesure de surface sur les images après une segmentation manuelle des contours et cela avant et après restauration. Nous avons comparé ces mesures aux mesures relevés sur les images macroscopiques. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau.5.3.

N° Souris	1	2	3	4	5	6	7
A <sub>1</sub>	50,94	25,79	50,71	17,76	41,85	57,32	9,72
A <sub>2</sub>	95,58	62,01	95,4	38,25	74,43	88,29	24,75
A <sub>3</sub>	53,13	27,72	52,02	18,36	40,5	54,81	9,75
Err <sub>1</sub> (%)	87	140	88	115	77	54	142
Err <sub>2</sub> (%)	4,4	7,4	2,5	3,3	3,2	4,3	4,8

**Tableau 5.2 : Mesures des surfaces (mm<sup>2</sup>) : A<sub>1</sub> sur images macroscopiques, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> sur images de bioluminescence avant et après restauration respectivement. Erreurs relatives (en %) Err<sub>1</sub> et Err<sub>2</sub>: avant et après restauration.**

Ces résultats montrent que sur les 7 souris incluses dans cette étude que l'erreur relative moyenne sur la mesure de la surface des tumeurs (bioluminescence comparée à la référence en lumière visible;  $|(A_2 \text{ ou } A_3) - A_1/A_1|$ ) passe de quasi 100% à 4.27%. Ce résultat confirme donc bien tout l'intérêt de la chaîne de traitement. Il valide aussi l'hypothèse que les tumeurs de surfaces inférieures au centimètre carré rayonnent uniformément et que l'imagerie de bioluminescence est un bon moyen de connaître et de suivre l'évolution de ces tumeurs in-vivo. Ce travail a fait l'objet d'une communication lors du GRETSI 2009 (Akkoul et al. '09b).

## 5.4 Conclusion

Nous constatons que la restauration des images de bioluminescence amène une information très proche de celle que l'on peut observer et mesurer sur les clichés photographiques (moins de 5% d'erreurs). Ce résultat met en évidence l'intérêt de notre algorithme de déconvolution pour les images de bioluminescence et plus généralement l'apport de la chaîne de traitement proposée.

La validation de la chaîne de traitement sur des images de bioluminescence réelles a permis de mettre en évidence l'intérêt de traiter ces images avant exploitation. Après

traitement avec la chaîne proposée, la totalité du bruit lié aux cosmiques est éliminée des images de bioluminescence et l'effet de diffusion est fortement réduit. On note une amélioration de la résolution spatiale par une atténuation des effets de diffusion de la peau, ce qui permet une meilleure localisation des sources lumineuses et ainsi une augmentation du pouvoir séparateur de sources très petites.

Dans la partie qui suit, nous allons appliquer la chaîne de traitement proposée sur différentes images de bioluminescence acquises pour différents modèles tumoraux.



## 6 Applications en cancérologie expérimentale

***Résumé :** Suite à la validation de la chaîne de traitement d'image proposée, nous avons mené deux études sur des modèles murins représentatifs des situations les plus fréquemment rencontrées en cancérologie expérimentale. La première porte sur la recherche de métastases et pour cette application, nous avons disposé d'un lot de quatre souris. Lors de cette expérimentation, des mesures dimensionnelles ont également été conduites par les utilisateurs puis comparées à des mesures effectuées sur les images restaurées. La deuxième application concerne l'évaluation de l'apport de la chaîne de traitement d'images dans l'analyse de tumeurs pulmonaires ainsi que des tumeurs osseuses. Pour cette dernière expérimentation, trois souris porteuses de ces modèles tumoraux ont été imagées.*

### 6.1 Introduction

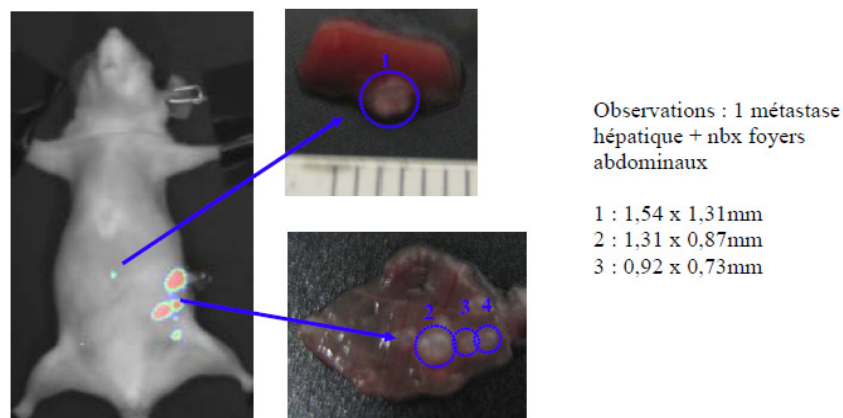
Il est reconnu que la détection précoce et le suivi des métastases qui se manifestent lors de l'évolution d'un cancer sont primordiaux pour la survie des patients. L'étude des phénomènes métastatiques est d'un intérêt indéniable pour la recherche en cancérologie et en pharmacologie car lorsqu'ils apparaissent, la maladie a gravi un stade à partir duquel les chances de guérison s'amointrissent. C'est pourquoi il nous a été proposé d'appliquer notre chaîne à deux protocoles dont l'un est relatif à la localisation et à la quantification des foyers tumoraux mais surtout des métastases et la deuxième concerne la restauration des images pour l'analyse de tumeurs pulmonaires et osseuses. Dans ce qui suit, nous présenterons donc les résultats obtenus pour ces deux situations.

## 6.2 Analyse de métastases

Le but de cette expérimentation est de tester s'il est possible de détecter les métastases à leurs premiers stades. Un lot de quatre souris présentant des métastases hépatiques et des tumeurs primaires a été imagé en bioluminescence. Après autopsie, le foie extrait a été photographié et des mesures au pied à coulisse des métastases visibles ont été menées par un biologiste spécialiste du modèle. Après filtrage et déconvolution des images de bioluminescence, des mesures dimensionnelles ont été effectuées puis comparées à celles mesurées par le biologiste qui sera désigné "l'expert" dans la suite du texte. Toutes les mesures ont été faites suivant deux directions, une verticale puis une horizontale.

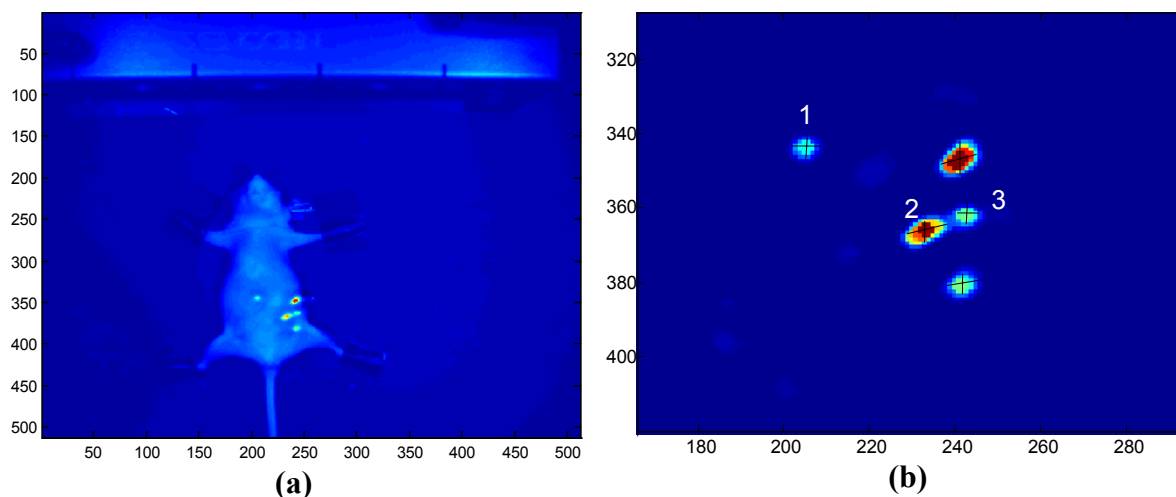
### 6.2.1 Première souris

Pour cette première souris Figure 6.1, l'expert a relevé une métastase hépatique et plusieurs foyers abdominaux qu'il a labellisé par un numéro. En Figure 6.1 nous avons ajouté les mesures dimensionnelles faites par l'expert in situ après ablation des tissus.



**Figure 6.1 : Superposition de l'image visible de la souris 1 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesures sur les tumeurs.**

Nous appliquons ensuite la chaîne de traitement d'images que nous avons proposée. L'image de bioluminescence acquise traitée est superposée à l'image de la souris acquise en lumière visible. La fusion obtenue est montrée en Figure 6.2 (a). Sur la Figure 6.2 (b), nous présentons la localisation et la labellisation des différents foyers bioluminescents pour une comparaison avec les relevés effectués par l'expert. Le résultat des comparaisons est exposé dans le tableau 6.1.



**Figure 6.2 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 1 à l'image de bioluminescence traitée en fausses couleurs. (b) Labellisation des foyers lumineux sélectionnés par l'expert.**

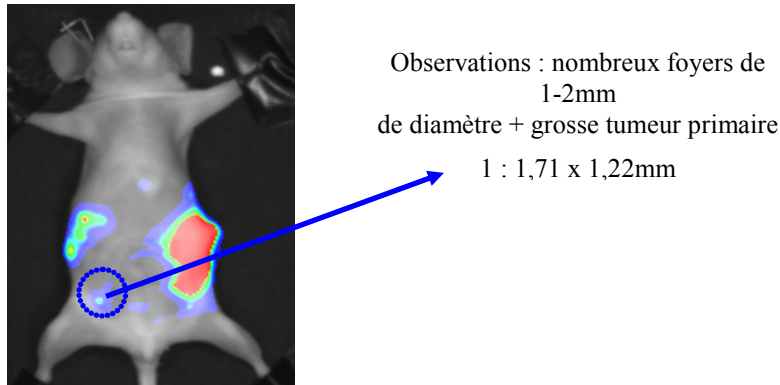
**Tableau 6.1 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 1.**

Identification	Mesures in situ (mm)	Mesures sur les images après traitement (mm)
1	Métastase hépatique (1,54x 1,31)	1,7 x 1,5
2	1,31 x 0,87	2,7 x 3,3
3	0,92 x 0,73	1,5 x 1,5

La mesure identifiée 1 faite sur l'image après traitement correspond assez bien à la mesure 1 relevée par l'expert. Les écarts sont liés au mode de mesure au pied à coulisse difficile à réaliser dans ce modèle tumoral. Cela montre que pour une métastase isolée, notre méthode permet une estimation correcte du phénomène.

Pour les mesures identifiées 2 et 3, les écarts constatés sont importants. De notre point de vue, la mesure n°2 sur les images de bioluminescence doit correspondre à la somme des mesures 2 et 3 de l'expert. En effet sur l'image Figure 6.1, on aperçoit uniquement deux flux lumineux et l'expert après ablation du foie, diagnostique trois foyers notés 2, 3 et 4 sans donner de mesures pour le n°4 compte tenu de la localisation visuelle très difficile sur l'organe. On voit là une limitation importante de notre approche à partir d'une seule image. Elle ne permet pas de distinguer deux sources superposées. Il faudrait donc mettre en place une méthode où plusieurs images sources seraient acquises avec différents angles de vue.

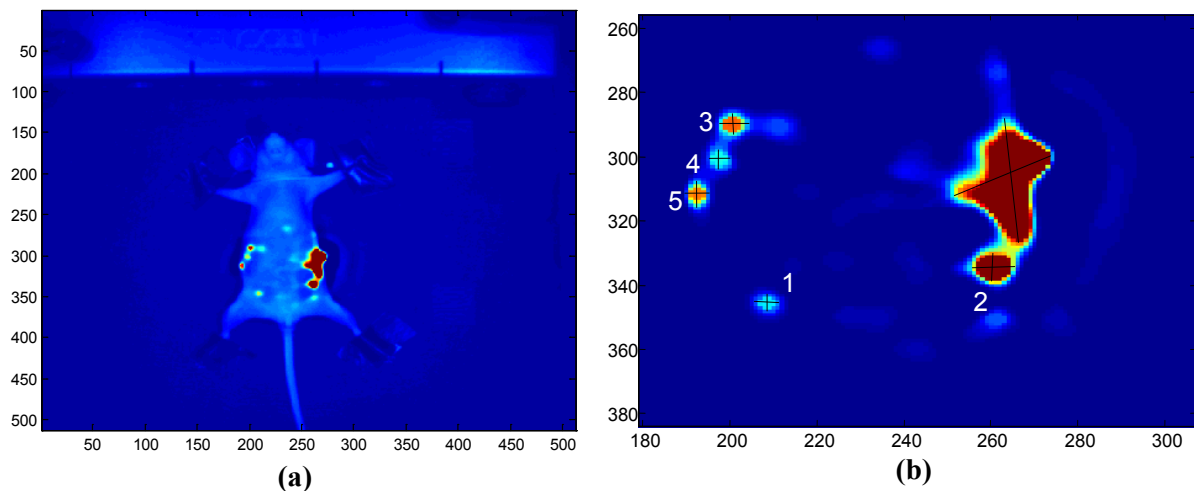
## 6.2.2 Deuxième souris



**Figure 6.3 : Superposition de l'image visible de la souris 2 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesures sur les tumeurs.**

Sur la Figure 6.3, on peut voir le relevé en bioluminescence superposé à l'image en lumière visible. L'expert observe une grosse tumeur primaire ainsi que de nombreux foyers. Il s'est intéressé plus particulièrement à un foyer noté n°1. Il l'a ensuite mesuré au pied à coulisse après dissection (image non disponible).

Sur la Figure 6.4 (a), nous avons fusionné l'image de bioluminescence traitée avec la chaîne à l'image de la souris effectuée en lumière visible. Après labellisation des différentes tumeurs et métastases comme reporté en Figure 6.4 (b), nous avons effectué un ensemble de mesures dont les relevés sont présentés dans le tableau 6.2. Sur la Figure 6.4 (b), nous constatons que la tumeur primaire serait composée d'une première tumeur assez conséquente et d'une autre plus petite et très proche. Ce premier résultat, très intéressant pour les utilisateurs, est à valider par d'autres essais cliniques.



**Figure 6.4 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 2 à l'image de bioluminescence restaurée représentée en fausses couleurs. (b) Labellisation de chaque foyer lumineux.**

**Tableau 6.2 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 2.**

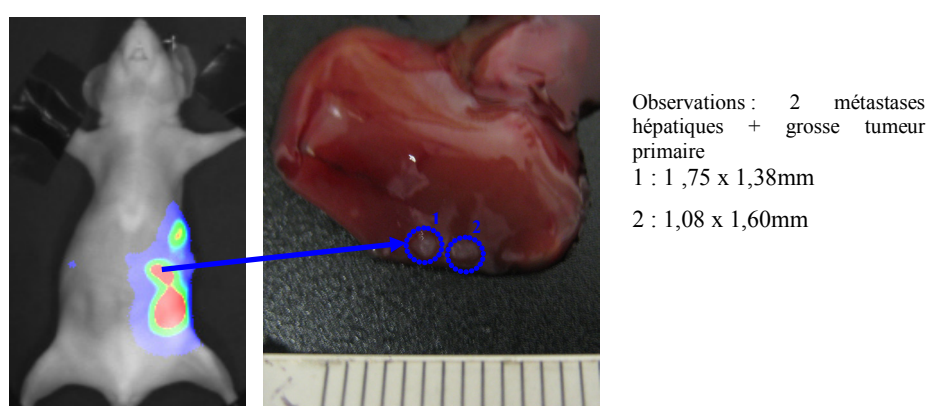
Identification	Mesures in situ (mm)	Mesures après traitement (mm)
1	1,71x 1,22	1,8 x 1,5
2	Grosse tumeur primaire	12,6 x 7,2
3	Nombreux foyers de 1 à 2 mm de diamètre	2,1 x 2,1
4		1,8 x 1,5
5		2,2 x 1,8

La mesure 1 faite sur l'image après traitement est très proche de la mesure relevée par l'expert. On a bien aussi une grosse tumeur primaire et les mesures faites sur les autres foyers lumineux labellisés montrent que les foyers ont bien des dimensions comprises entre 1 et 2 mm comme mentionné par l'expert.

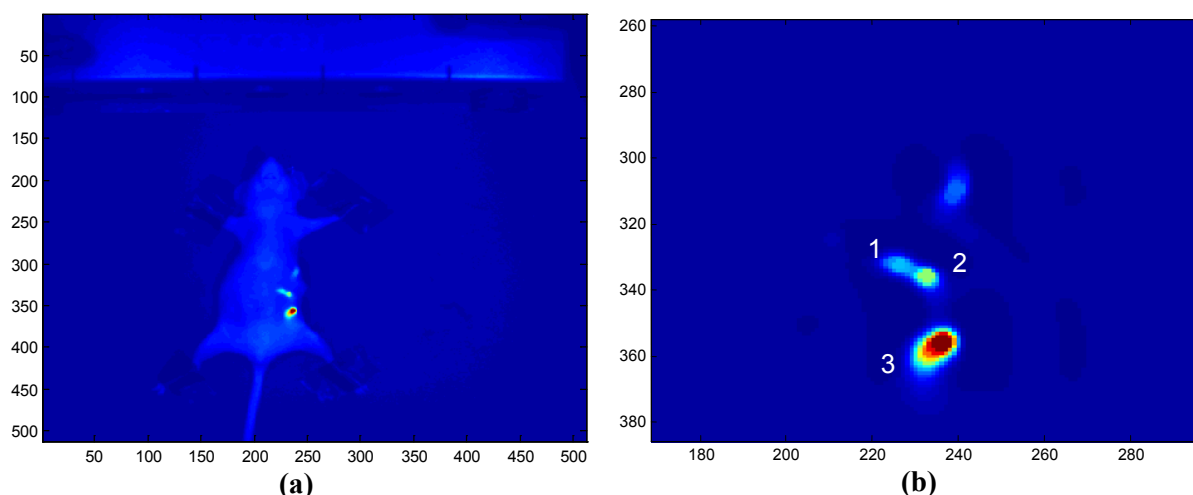
On note comme dans l'expérience précédente tout l'intérêt d'un outil qui permet d'avoir des mesures précises des différentes tumeurs sans avoir à disséquer l'animal.

### 6.2.3 Troisième souris

La même démarche a été conduite pour ce troisième cas. Les données de départ sont reportées en Figure 6.5 et le résultat du filtrage et de la déconvolution des images de bioluminescence est visible sur les Figure 6.6 (a) et (b).



**Figure 6.5 : Superposition de l'image visible de la souris 3 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesure sur les tumeurs.**



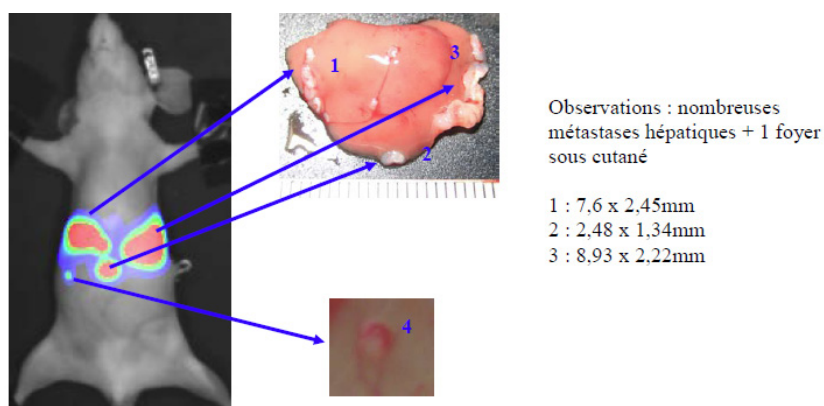
**Figure 6.6 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 3 à l'image de bioluminescence restaurée en fausses couleurs, (b) Labellisation de chaque foyer lumineux.**

**Tableau 6.3 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 3.**

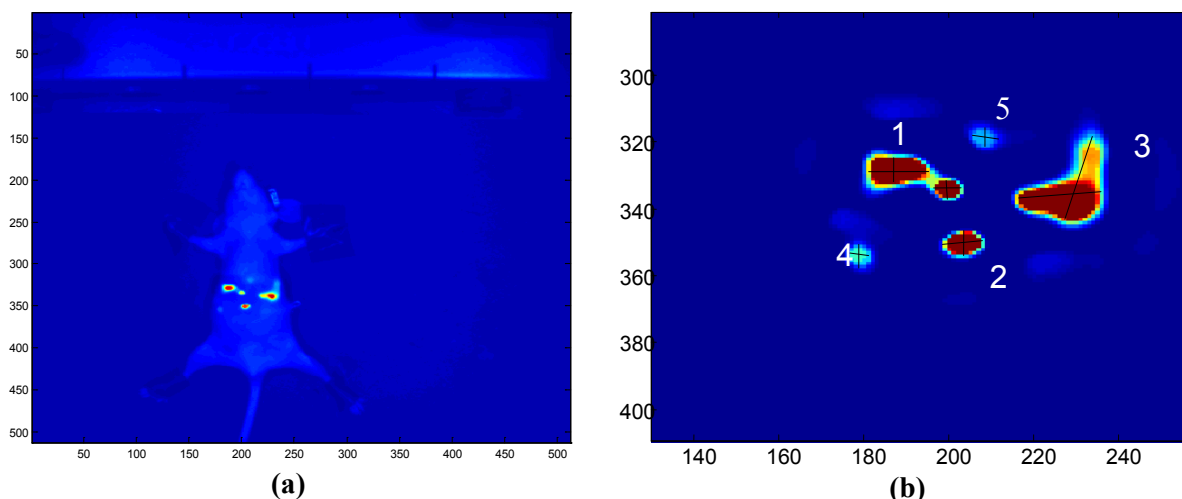
Identification	Mesures in situ (mm)	Mesures après traitement (mm)
1	Deux métastases hépatiques	1,8 x 1,4
2	1- 1,75 x 1,38 2- 1,08 x 1,60	1,20 x 1,50

Dans cette expérimentation, on distingue uniquement un gros foyer sur la Figure 6.5. Après restauration (Figure 6.6.b), on voit que ce foyer est en fait composé d'un gros foyer principal et de deux petits foyers proches. Les mesures expert et sur l'image sont proches. Ce qui est très encourageant pour une exploitation de la bioluminescence en routine.

#### 6.2.4 Quatrième souris



**Figure 6.7 : Superposition de l'image visible de la souris 4 à l'image de bioluminescence en fausses couleurs, ablation et relevés de mesures sur les tumeurs.**



**Figure 6.8 : (a) Superposition de l'image visible de la souris 4 à l'image de bioluminescence restaurée en fausses couleurs. (b) Labellisation de chaque foyer lumineux.**

**Tableau 6.4 : Tableau des résultats de comparaison pour la souris 4.**

Identification	Mesures in situ (mm)	Mesures après traitement (mm)
1	Nombreuses métastases hépatiques 1 - 7,6 x 2,45 2 - 2,48 x 1,34 3 - 8,93 x 2,22	7,8 x 2,6
2		3,3 x 2,4
3		8,7 x 2,5
4	Un foyer sous cutanée	1,8 x 1,8

L'image de la dissection montre toute la difficulté d'analyse visuelle et au pied à coulisse.

Les mesures faites sur l'image après traitement sont reportées dans le Tableau 6.4. Ces valeurs sont proches de celles effectuées au pied à coulisse par l'expert. Ceci confirme les bons résultats obtenus avec les trois premières souris.

De plus, on peut constater sur la Figure 6.8 (b) l'apparition d'un petit foyer (labélisé 5 sur l'image restaurée) qui n'était pas visible sur l'image de bioluminescence avant traitement. Cela permet une analyse plus fine dans des cas complexes.

#### **6.2.4.1 Conclusion sur les résultats obtenus**

Les mesures faites sur les images de bioluminescence après restauration donnent des résultats proches de ceux relevés au pied à coulisse par un expert. Après traitement des

images acquises par la chaîne de traitement proposée, nous constatons une amélioration non négligeable de la résolution spatiale du signal de bioluminescence, ce qui permet la différenciation de foyers lumineux même quand ils sont très proches, donc une meilleure détection des métastases. Les expérimentations menées ont été pleinement concluantes et on peut envisager que les systèmes d'acquisition d'images de bioluminescence puisse intégrer la chaîne de traitement proposée.

Par contre, notre approche n'est pas opérationnelle si les foyers lumineux sont superposés.

## **6.3 Analyse de tumeurs osseuses et pulmonaires**

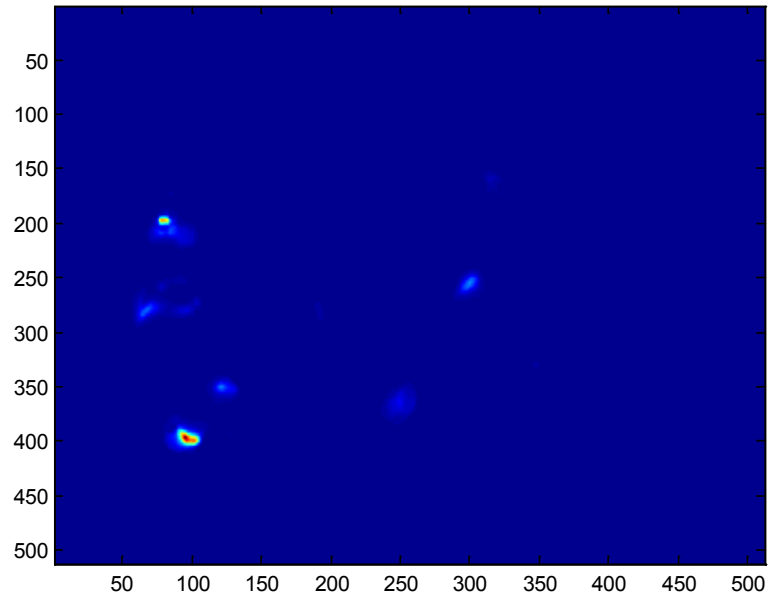
Le but de cette manipulation est de voir si la restauration de ce type d'images améliore la résolution et la détection quand on est en présence de tumeurs osseuses et thoraciques. Il s'agit de cas difficiles en cancérologie et il est important que les utilisateurs de l'imagerie par bioluminescence puissent bénéficier d'un réel apport du traitement d'image pour établir un bilan fiable de l'extension tumorale. Pour cette expérimentation, nous disposons d'un lot de trois souris ayant des tumeurs pulmonaires ainsi que des métastases ganglionnaires et osseuses. Nous avons fait une seule acquisition de bioluminescence pour ces trois souris sachant que l'appareil peut accueillir 5 souris simultanément. Puis nous avons appliqué notre chaîne de traitement d'images. A noter que pour cette expérimentation, il n'y a pas eu de mesures effectuées mais un simple contrôle visuel.

### **6.3.1 Résultats**

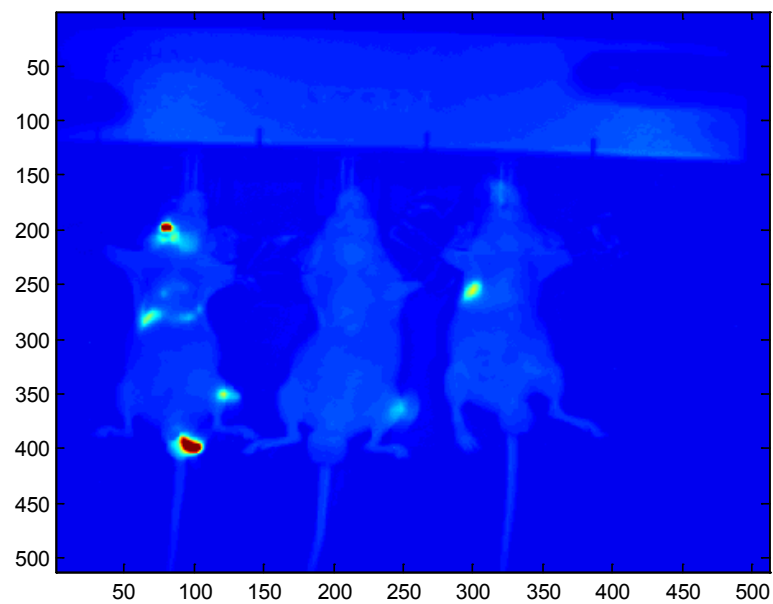
#### **6.3.1.1 Image de bioluminescence avant traitement**

La Figure 6.9 montre l'image de bioluminescence acquise et la Figure 6.10 montre la même image après fusion avec l'image des trois souris prise dans le domaine du visible. Sur la Figure 6.10, il est possible de constater sur la souris de gauche plusieurs foyers tumoraux dans le cou, au niveau pulmonaire mais de manière diffuse, sur la patte arrière et au niveau de la queue. Sur les deux autres souris, il n'apparaît à première vue qu'un seul foyer par souris.





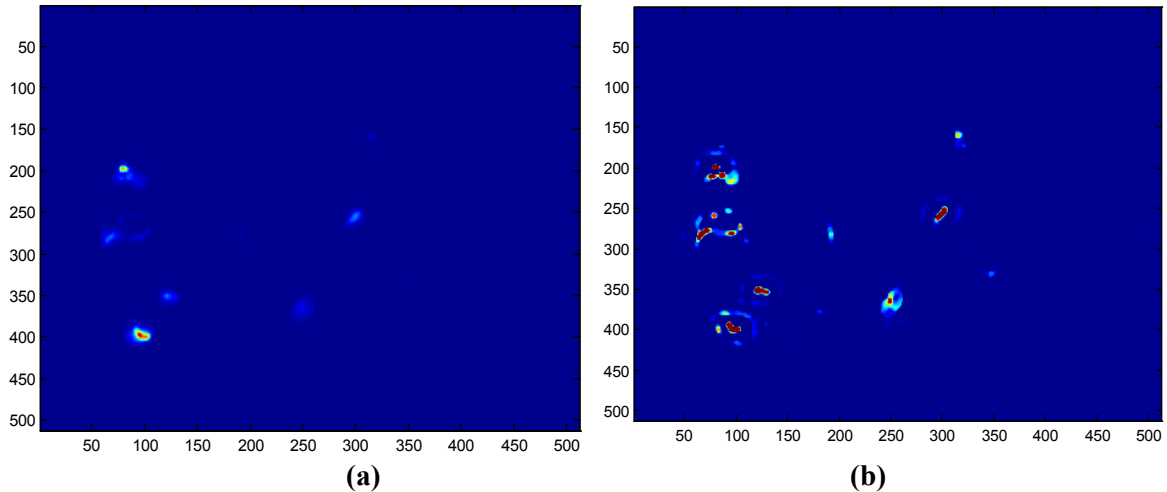
**Figure 6.9 : Image de bioluminescence acquise.**



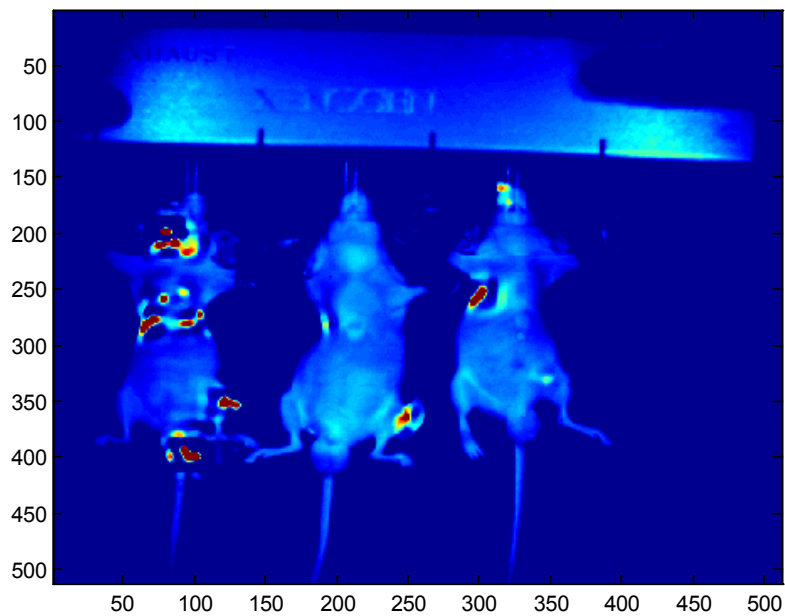
**Figure 6.10 : Image avant restauration fusionnée avec l'image optique.**

### **6.3.1.2 Image de bioluminescence après traitement avec la chaîne**

L'image de bioluminescence obtenue après traitement est présentée sur la Figure 6.11. La fusion de cette dernière avec l'image des trois souris acquise en lumière visible est montrée en Figure 6.12.



**Figure 6.11 : (a) Image avant traitement, (b) même image restaurée avec la chaîne.**



**Figure 6.12 : Image restaurée avec la chaîne fusionnée avec l'image optique.**

### 6.3.1.3 Observations

On note qu'après restauration de l'image, les foyers lumineux sont plus distincts sur ces trois souris. Sur la souris la plus à gauche de l'écran (celle où l'activité bioluminescente est la plus forte) notamment au niveau du cou et du torse, les tumeurs ganglionnaires et pulmonaires sont maintenant bien distinctes. On note aussi la mise en évidence d'un foyer lumineux sur la patte arrière gauche de la souris la plus à droite de l'écran ; ce que l'on ne voyait pas sur l'image de départ. Un autre foyer a également été mis en évidence au niveau du

flanc droit de la souris du centre. Ces deux foyers dont l'existence a été confirmée par le biologiste n'auraient pas été visibles sans la mise en place du processus de restauration. Ces résultats confirment donc que la chaîne de traitement permet une meilleure exploitation des images de bioluminescence.

## **6.4 Conclusion**

Les résultats obtenus lors de ces deux applications cliniques sur les différentes acquisitions en imagerie de bioluminescence confirment les travaux de validation menés au chapitre IV. Il en ressort qu'une chaîne de traitement d'images s'impose à la sortie du système d'acquisition pour une meilleure exploitation des images en restaurant leur résolution qui été dégradée par la diffusion des photons de bioluminescence et d'un ensemble de facteurs liés au système d'acquisition. Elle permet une meilleure localisation des foyers et une meilleure quantification. L'implantation de cette fonctionnalité devrait offrir une réelle plus value au système d'imagerie de bioluminescence.

## Conclusion

Ce travail de thèse avait pour objectif l'amélioration de la qualité d'images de bioluminescence. Cela s'est traduit par la proposition et la validation d'une chaîne de traitement pour ces images dégradées. Ces dégradations sont dues en grande partie aux phénomènes de diffusion et d'absorption subis par le signal lumineux lors de la traversée des tissus et de la peau de l'animal. A cela s'ajoute un bruit impulsionnel lié au rayonnement cosmique et un bruit d'acquisition. La chaîne de traitement proposée se compose de deux parties : une partie filtrage suivie d'une partie de déconvolution.

La première partie de ce travail a été consacrée à la modélisation de la formation des images de bioluminescence et à l'étude des différents bruits liés à l'acquisition de ce type d'images. Les travaux menés ont abouti à la proposition d'un modèle de formation des images de bioluminescence. Ce modèle prend en compte le processus Poissonien intervenant lors de la formation de l'image ainsi que le bruit lié à cette acquisition. Cette modélisation nous a permis de mettre sous un formalisme mathématique les phénomènes mis en jeu lors de formation des images. A partir de ce modèle, nous avons pu choisir les approches possibles pour améliorer la qualité des images acquises.

La deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude, la mise au point ainsi que la validation de la chaîne de traitement des images de bioluminescence. La première étape comporte un filtre basé médian qui permet de supprimer le bruit impulsionnel. L'étude bibliographique et les tests de différentes méthodes ont permis de définir un nouveau filtre très performant, qui permet d'éliminer le bruit impulsionnel dû aux cosmiques, tout en conservant pleinement l'information. La deuxième étape est un processus de déconvolution. Nous avons étudié différentes méthodes de déconvolution que nous avons classé en cinq catégories (linéaires, non linéaires, statistiques, aveugles et basées ondelettes). Comme la plupart des méthodes de déconvolution nécessitent de connaître la réponse impulsionnelle du système, nous l'avons estimée de manière expérimentale. Afin de dégager une méthode adaptée à l'imagerie de bioluminescence, nous avons testé ces méthodes sur des images de synthèse générées par le modèle de formation défini précédemment. Les résultats obtenus ont montré que la déconvolution aveugle initialisée par l'estimation expérimentale de la réponse impulsionnelle mesurée était la plus performante. Nous avons ainsi pu montrer à travers les

différentes simulations menées que cette méthode de déconvolution permet une amélioration significative de la qualité de nos images.

La troisième partie concerne la validation de la chaîne de traitement et des résultats en expérimentation animale. Pour la validation, le CIPA a mis à notre disposition des lots de souris porteuses de tumeurs marquées pour la bioluminescence. Nous avons imagé ces souris avec le système d'acquisition et les avons comparé à la réalité terrain. Les résultats obtenus indiquent que l'erreur moyenne sur la mesure de la surface des tumeurs passe d'environ 100% (images brutes) à 4,5% (images filtrées et restaurées avec déconvolution aveugle). Ceci montre tout l'intérêt de traiter les images de bioluminescence avant exploitation.

Nous avons aussi mené des études cliniques afin de démontrer l'intérêt de traiter ce type d'images. Nous avons ainsi vu au travers de nos différentes expérimentations que la chaîne proposée permettait de mettre en évidence des sources lumineuses qui n'étaient pas visibles avant traitement ainsi qu'une meilleure distinction des sources proches.

Pour conclure, nous avons montré à travers ce travail que le traitement des images de bioluminescence permet une amélioration non négligeable de la résolution spatiale et une meilleure distinction de sources tumorales très proches ce qui est un apport non négligeable pour les utilisateurs de cette modalité d'imagerie.

Les contributions principales de cette thèse sont les suivantes :

- ✚ La proposition d'un modèle mathématique pour la formation des images de bioluminescence. Ce modèle décrit le processus qui régit la formation de ces images.
- ✚ Une étude de la nature du bruit lié à l'acquisition des images de bioluminescence.
- ✚ La proposition d'un nouveau filtre basé médian pour la suppression du bruit impulsionnel lié aux cosmiques présent lors de l'acquisition des images de bioluminescence.

- ✚ Une étude comparative d'un nombre de méthodes de déconvolution pour sélectionner la méthode la plus adaptée à la déconvolution des images de bioluminescence.
- ✚ La validation de la chaîne de traitement d'image proposée pour les images de bioluminescence réelles. Cette chaîne est composée du filtre basé médian proposé et de la méthode de déconvolution sélectionnée.

En guise de perspective, en ce qui concerne le filtre médian proposé, il reste le problème de l'arrêt des itérations, problème inhérent à ce type de filtre. Il est donc envisagé de poursuivre nos investigations pour l'amélioration de ce type de filtrage et en particulier pour la définition d'un critère d'arrêt. Ceci permettrait d'obtenir des performances optimales de manière automatique. Une des pistes envisagées est de s'intéresser au nombre de pixels modifiés à chaque itération du filtre.

Nous envisageons une étude longitudinale pour le suivi de l'évolution de tumeurs en réponse à un traitement médicamenteux. Pour cette étude, nous allons utiliser un lot de souris porteuses de tumeurs marquées pour la bioluminescence. Les images de bioluminescence relevées au cours de ce suivi pourront être traitées avec la chaîne proposée et comparées à celles non traitées pour quantifier l'apport de la chaîne.

L'un des points cruciaux en cancérologie est la détection de métastases à leur premier stade d'apparition. Ceci est rendu difficile par le fait que ces petites entités sont souvent très proches de grosses tumeurs. Le signal lumineux émis par ces petites sources est masqué par le signal des tumeurs qui est plus intense et diffus. Afin de détecter ces petites sources, nous pensons qu'il faut poursuivre la recherche et identifier ou imaginer des méthodes de déconvolution adaptées.

Enfin, il est envisagé de mener un transfert de technologie afin de donner une plus value à la chaîne de traitement d'images de bioluminescence que nous avons proposée et validée.

# Bibliographie

- Akkoul, S., R. Lédée, R. Leconge et R. Harba. 2009a. A new detector for switching median filter. Paper read at Proceedings of the 6th International Symposium on Image and Signal Processing and Analysis (ISPA'09)", Salzburg, Austria, Sep. 2009
- Akkoul, S., R. Lédée, R. Leconge et R. Harba. 2010. A New Adaptive Switching Median Filter. *Signal processing letters, IEEE* 17 (6):587-590.
- Akkoul, S., R. Lédée, R. Leconge, R. Harba, S. Pesnel, S. Lerondel et A. Lepape. 2009b. Validation Expérimentale d'une Chaîne de Traitement d'Images de Bioluminescence chez le Petit Animal *GRETSI, Groupe d'Etudes du Traitement du Signal et des Images, 2009*).
- Akkoul, S., R. Lédée, R. Leconge, C. Léger, R. Harba, S. Pesnel, S. Lerondel, A. Lepape et L. Vilcahuaman. 2008. Comparison of image restoration methods for bioluminescence imaging. In *Lecture Notes in Computer Science*, edited by Springer. Cherboung 163-172.
- Ayers, G. R. et J. C. Dainty. 1988. Iterative blind deconvolution method and its applications. *Opt. Lett.* 13 (7):547.
- Banham, M. R. et A. K. Katsaggelos. 1997. Digital image restoration. *Signal Processing Magazine, IEEE* 14 (2):24-41.
- Bendat, J. S. et A. G. Piersol. 1971. *RANDOM DATA: Analysis and measurement procedures* Wiley-Interscience Editions.
- Berkache, A., Sonia.,. 2009a. Approche multiéchelle pour la restauration des images de bioluminescence. Master, faculté des sciences, université d'Orléans.
- Berkache, A., Sonia.,. 2009b. Approche multiéchelle pour la restauration des images de bioluminescence. Master, faculté des sciences, université d'Orléans.
- Besdok, E. 2004. Impulsive noise suppression from images by using Anfis interpolant and lillietest. *EURASIP Journal on Applied Signal Processing* 2004:2423-2433.
- Biamond, J., R. L. Lagendijk et R. M. Mersereau. 1990. Iterative methods for image deblurring. *Proceedings of the IEEE* 78 (5):856-883.
- Brownrigg, D. R. K. 1984. The weighted median filter. *Commun. ACM* 27 (8):807-818.
- Campisi, P. et K. Egiazarian. 2007. *Blind Image Deconvolution : Theory and Applications.*: Boca Raton, Fla. CRC Press 2007.
- Chan, R. H., H. Chen et M. Nikolova. 2004. An iterative procedure for removing random-valued impulse noise. *Signal Processing Letters, IEEE* 11 (12):921-924.
- Charalambous, C., F. K. Ghaddar et K. Kouris. 1991. Two iterative image restoration algorithms with applications to nuclear medicine. Paper read at IEEE International Symposium on Circuits and Systems.
- Chen, T., K.-K. Ma et L.-H. Chen. 1999. Tri-state median filter for image denoising. *Image Processing, IEEE Transactions on* 8 (12):1834-1838.
- Chen, T. et Wu. 2001a. Adaptive impulse detection using center-weighted median filters. *Signal Processing Letters, IEEE* 8 (1):1-3.
- Chen, T. et H. R. Wu. 2001b. Space variant median filters for the restoration of impulse noise corrupted images. *Circuits and Systems II: Analog and Digital Signal Processing, IEEE Transactions on* 48 (8):784-789.
- Chia-Chi, C., H. Jeng-Jong, T. Gann, T. Yun-Long, W. Shyh-Jen et W.-P. Jaqueline. 2007. Monitoring and quantitative assessment of tumor burden using in vivo bioluminescence imaging. *Nuclear instruments & methods in physics research.*

- Section A, Accelerators, spectrometers, detectors and associated equipment* 571 (1-2):437-441.
- Chomik, A. 1997. Deconvolution 3D orientée vers la reconstruction d'objets biologiques observés en microscopie optique de fluorescence, Université de Haute Alsace.
- Contag, C. H. et M. H. Bachmann. 2002. Advances In In-Vivo Bioluminescence Imaging Of Gene Expression. *Annual Review of Biomedical Engineering* 4 (1):235-260.
- Contag, C. H., D. Jenkins, P. R. Contag et R. S. Negrin. 2000. Use of Reporter Genes for Optical Measurements of Neoplastic Disease In vivo. *Neoplasia* 2 (1-2):41-52.
- Dang, D. et W. Luo. 2007. Impulse noise removal utilizing second-order difference analysis: Elsevier North-Holland, Inc., 2017-2025.
- Demoment, G. 1985. Déconvolution des signaux. Cours de l'Ecole supérieure d'électricité.
- Dempster, A. P., N. M. Laird et R. D. B. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the royal statistical society* 39 (1):1-38.
- Dey, N., L. Blanc-Feraud, C. Zimmer, P. Roux, Z. Kam, J.-C. Olivo-Marin et J. Zerubia. 2006. Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution. *Microscopy Research and Technique* 69 (4):260-266.
- Dhawan, A. P., R. M. Rangayyan et R. Gordon. 1985. Image restoration by Wiener deconvolution in limited-view computed tomography. *Appl. Opt.* 24 (23):4013-4020.
- Dong, Y., R. H. Chan et X. Shufang. 2007. A Detection Statistic for Random-Valued Impulse Noise. *Image Processing, IEEE Transactions on* 16 (4):1112-1120.
- Dong, Y. et S. Xu. 2007. A New Directional Weighted Median Filter for Removal of Random-Valued Impulse Noise. *Signal Processing Letters, IEEE* 14 (3):193-196.
- Doyle, T. C., S. M. Burns et C. H. Contag. 2004. In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cellular microbiology* 6 (4):303-317.
- Du, H. et K. J. Voss. 2004. Effects of Point-Spread Function on Calibration and Radiometric Accuracy of CCD Camera. *Appl. Opt.* 43 (3):665-670.
- Edinger, M., Y.-a. Caob, Y. S. Hornigc, D. E. Jenkinsc, M. R. Vernerisa, M. H. Bachmann, R. S. Negrina et C. H. Contag. 2002. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *European Journal of Cancer* 38 (16):2128-2136.
- Figueiredo, M. A. T. et R. D. Nowak. 2003. An EM algorithm for wavelet-based image restoration. *IEEE Transactions on Image Processing*, 12 (8):906-916.
- Florentin-Nielsen, R., M. J. Andersen et S. P. Nielsen. 1995. Cosmic Ray Events and Natural Radioactivity in CCD Cryostats. *IAU Symposium* 167.
- Gonzalez, R. C. et R. E. Woods. 2002. *Digital image processing*: Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- Greer, L. r. et A. A. Szalay. 2002 Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence* 17 (1):43-74.
- Groom, D. 2002. Cosmic rays and other nonsense in astronomical CCD imagers. *Experimental Astronomy* 14:45-55.
- Hadamard, J. 1923. Lectures on Cauchy's Problem in Linear Partial Differential Equations. *New Haven, Yale University Press*.
- Hardy, J., M. Edinger, M. H. Bachmann, R. Negrin, C. Fathman et C. Contag. 2001. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Experimental Hematology* 29 (12):1353-1360.
- Holmes, T. J. 1992. Blind deconvolution of quantum-limited incoherent imagery: maximum-likelihood approach. *J. Opt. Soc. Am. A* 9 (7):1052-1061.
- Jalobeanu, A. 2001. Modèles, estimation bayésienne et algorithmes pour la déconvolution d'images satellitaires et aériennes, Nice - Sophia Antipolis, 2001.



- Jalobeanu, A., R. D. Nowak, J. Zerubia et M. A. T. Figueiredo. 2002. Satellite and aerial image deconvolution using an EM method with complex wavelets. Paper read at Image Processing. 2002. Proceedings. 2002 International Conference on.
- Jammal, G. 2001. Multiscale Image Restoration in Nuclear Medecine, université Darmstadt, Allemagne.
- Jammal, G. et A. Bijaoui. 1999. Restauration et débruitage d'images en médecine nucléaire: l'approche multir solution. *Dix-septi me colloque GRETSI, Vannes*.
- Jammal, G. et A. Bijaoui. 2004. DeQuant: a flexible multiresolution restoration framework. *Signal Processing* 84 (7):1049-1069.
- Kang, C.-C. et W.-J. Wang. 2008. Modified switching median filter with one more noise detector for impulse noise removal. *AEU - International Journal of Electronics and Communications* In Press, Corrected Proof.
- Katsaggelos, A. K. 1989. Iterative Image restoration algorithms. *Optical Engineering* 28 (7):735-748.
- Katsaggelos, A. K., J. Biemond, R. W. Schafer et R. M. Mersereau. 1991. A regularized iterative image restoration algorithm. *IEEE Transactions on Signal Processing* 39 (4):914-929.
- Ko, S.-J. et Y. H. Lee. 1991. Center weighted median filters and their applications to image enhancement. *IEEE Transactions on Circuits and Systems* 38 (9):984-993.
- Kundur, D. et D. Hatzinakos. 1996a. Blind image deconvolution. *Signal Processing Magazine, IEEE* 13 (3):43-64.
- Kundur, D. et D. Hatzinakos. 1996b. Blind image deconvolution revisited. *Signal Processing Magazine, IEEE* 13 (6):61-63.
- Kundur, D. et D. Hatzinakos. 1998. A novel blind deconvolution scheme for image restoration using recursive filtering. *IEEE Transactions on Signal Processing* 46 (2):375-390.
- Lagendijk, R. L. et J. Biemond. 2000. Basic Methods for Image Restoration and Identification. *Handbook of image and video processing, Al Bovik, Academic Press, San Diego, 2000*.
- Landweber, L. 1951. An Iteration Formula for Fredholm Integral Equations of the First Kind. *American Journal of Mathematics* 73:615-624
- Lantéri, H., M. Roche, P. Gaucherel et C. Aime. 2002. Ringing reduction in image restoration algorithms using a constraint on the inferior bound of the solution. *Signal Process.* 82 (10):1481-1504.
- Lehr, J., J. B. Sibarita et J. M. Chassery. 1998. Image restoration in X-ray microscopy: PSF determination and biological applications. *Image Processing, IEEE Transactions on* 7 (2):258-263.
- Lin, Y., Y. Ruikang, M. Gabbouj et Y. Neuvo. 1996. Weighted median filters: a tutorial. *Circuits and Systems II: Analog and Digital Signal Processing, IEEE Transactions on* 43 (3):157-192.
- Lucy, L. B. 1974. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astronomical Journal* 79:745.
- Luo, W. 2006. An efficient detail-preserving approach for removing impulse noise in images. *Signal Processing Letters, IEEE* 13 (7):413-416.
- Mann, H. B. et A. Wald. 1942. On the Choice of the Number of Class Intervals in the Application of the Chi Square Test. *The Annals of Mathematical Statistics* 13 (3):306-317.

- Massoud, T. F. et S. S. Gambhir. 2003. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & development* 17 (5):545-580.
- Max, J. et J.-L. Lacoume. 2004. *Méthodes et techniques de traitement du signal*. Dunod ed.
- Mignotte, M. et J. Meunier. 2000. Three-dimensional blind deconvolution of SPECT images. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 47 (2):274-280.
- Neelamani, R., H. Choi et R. Baraniuk. 1999. Wavelet-based deconvolution for ill-conditioned systems. In *Acoustics, Speech, and Signal Processing, IEEE International Conference on* 3241-3244.
- Ng, P.-E. et K.-K. Ma. 2006. A switching median filter with boundary discriminative noise detection for extremely corrupted images. *Image Processing, IEEE Transactions on* 15 (6):1506-1516.
- Nikolova, M. 2004. A Variational Approach to Remove Outliers and Impulse Noise. *J. Math. Imaging Vis.* 20 (1-2):99-120.
- Oleg, V. M. et R. A. Dan. 2007. Deconvolution of medical images from microscopic to whole body images. In *Blind Image Deconvolution: Theory and Applications* edited by C. Press, 448.
- Oppenheim, A. V., R. W. Schafer et T. G. Stockham, Jr. 1968. Nonlinear filtering of multiplied and convolved signals. *Proceedings of the IEEE* 56 (8):1264-1291.
- Paroo, Z., R. Bollinger, D. Braasch, E. Richer, D. Corey, P. Antich et R. M. . 2004. Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. *Molecular Imaging* 3 (2):117-124.
- Press, W. H., S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling et B. P. Flannery. 1992. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press.
- Rehemtulla, A., L. D. Stegman, S. J. Cardozo, S. Gupta, D. E. Hall, C. H. Contag et B. D. Ross. 2000. Rapid and Quantitative Assessment of Cancer Treatment Response Using In Vivo Bioluminescence Imaging. *Neoplasia* 2 (6):491-495.
- Rettig, G. R., M. McAnuff, D. Liu, J.-S. Kim et K. G. Rice. 2006. Quantitative bioluminescence imaging of transgene expression in vivo. *Analytical Biochemistry* 355:90-94.
- Rice, B. W., M. D. Cable et M. B. Nelson. 2001. In vivo imaging of light-emitting probes. *Journal of Biomedical Optics* 6 (4):432-340.
- Richardson, W. H. 1972. Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration. *J. Opt. Soc. Am.* 62 (1):55-59.
- Roda, A., P. Pasini, M. Mirasoli, E. Micheli et M. Guardigli. 2004. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence *Trends in Biotechnology* 22 (6):295-303.
- Russo, F. 1999. Hybrid neuro-fuzzy filter for impulse noise removal. *Pattern Recognition* 32 (11):1843-1855.
- Russo, F. 2000. Noise removal from image data using recursive neurofuzzy filters. *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on* 49 (2):307-314.
- Sadikot, R. T. et T. S. Blackwell. 2005. Bioluminescence imaging. *The Proceedings of the American Thoracic Society* 2 (6):537-540.
- Sarder, P. et A. Nehorai. 2006. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *Signal Processing Magazine, IEEE* 23 (3):32-45.
- Shepp, L. A. et Y. Vardi. 1982. Maximum Likelihood Reconstruction for Emission Tomography. *Medical Imaging, IEEE Transactions on* 1 (2):113-122.
- Shimomura, O. 2006. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. World Scientific ed: World Scientific.

- Shung, K. K., M. B. Smith et B. M. W. Tsui. 1992. *Principles of medical imaging*. San Diego: Academic Press.
- Snyder, D. L., A. M. Hammoud et R. L. White. 1993. Image recovery from data acquired with a charge-coupled-device camera. *J. Opt. Soc. Am. A* 10 (5):1014-1023.
- Soulez, F. 2008. Une approche problèmes inverses pour la reconstruction de données multi-dimensionnelles par méthodes d'optimisation. Doctorat, Université Jean Monnet- Saint Etienne.
- Starck, J. L., E. Pantin et F. Murtagh. 2002. Deconvolution in Astronomy: A Review. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific* 114:1051-1069.
- Stockham, T. G., Jr., T. M. Cannon et R. B. Ingebretsen. 1975. Blind deconvolution through digital signal processing. *Proceedings of the IEEE* 63 (4):678-692.
- Sun, T. et Y. Neuvo. 1994. Detail-preserving median based filters in image processing. *Pattern Recogn. Lett.* 15 (4):341-347.
- Tikhonov, A. N. et V. I. Arsenin. 1977. *Solutions of ill-posed problems* New York Wiley, 236-255.
- Tukey, J. W. 1974. Nonlinear (Nonsuperimposable) Methods for Smoothing Data. *Proc. Conf. Rec. Eascon*: 673 673
- Van De Ville, D., M. Nachtegaele, D. Van der Weken, E. E. Kerre, W. Philips et I. Lemahieu. 2003. Noise reduction by fuzzy image filtering. *Fuzzy Systems, IEEE Transactions on* 11 (4):429-436.
- Van Kempen, G. M. P., L. J. Van Vliet, P. J. Verveer et H. T. M. Van Der Voort. 1997. A quantitative comparison of image restoration methods for confocal microscopy. *Journal of Microscopy* 185 (3):354-365.
- Wang, L.-q., X.-x. Ni, Z.-k. Lu, X.-f. Zheng et Y.-s. Li. 2004. Enhancing the quality metric of protein microarray image. *Journal of Zhejiang University - Science A* 5 (12):1621-1628.
- Waniak, W. 1997. Image restoration by simple adaptive deconvolution. *Astron. Astrophys. Suppl. Ser.* 124 (1):197-203.
- Webb, S., A. P. Long, R. J. Ott, M. O. Leach et M. A. Flower. 1985. Constrained deconvolution of SPECT liver tomograms by direct digital image restoration. *Med Phys.* 12 (1):53-58.
- Xu, H., G. Zhu, F. Peng et D. Wang. 2004. Adaptive fuzzy switching filter for images corrupted by impulse noise. Paper read at Communications, Circuits and Systems, 2004. ICCCAS 2004. 2004 International Conference on.
- Yuan, S.-Q. et Y.-H. Tan. 2006. Impulse noise removal by a global-local noise detector and adaptive median filter. *Signal Processing* 86 (8):2123-2128.
- Yuan, S.-Q., Y.-H. Tan et H.-L. Sun. 2007. Impulse noise removal by the difference-type noise detector and the cost function-type filter. *Signal Processing* 87 (10):2417-2430.
- Zhang, S. et M. A. Karim. 2002. A new impulse detector for switching median filters. *Signal Processing Letters, IEEE* 9 (11):360-363.
- Zhou, W. et D. Zhang. 1999. Progressive switching median filter for the removal of impulse noise from highly corrupted images. *Circuits and Systems II: Analog and Digital Signal Processing, IEEE Transactions on* 46 (1):78-80.
- Zinn, K. R., T. R. Chaudhuri, A. A. Szafran, D. O'Quinn, C. Weaver, K. Dugger, D. Lamar, R. A. Kesterson, X. Wang et S. J. Frank. 2008. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR journal* 49 (1):103-115.

# Annexes

## Annexe A : Détails de l'algorithme de déconvolution par estimation du maximum de vraisemblance

Dans cette annexe, nous allons montrer comment est obtenu l'algorithme de Lucy-Richardson, qui est la base de l'algorithme de déconvolution aveugle choisi comme deuxième bloc de la chaîne de traitement proposée. Nous allons voir comment découle l'algorithme de Lucy-Richardson standard à partir de l'hypothèse d'un processus de Poisson.

Si on considère le modèle de formation d'images suivant :

$$i(x) = (o * h)(x, y), \quad (1)$$

où, \* représente l'opérateur de convolution,  $i$  est l'image acquise,  $o$  est l'image réelle non dégradée et  $h$  la réponse impulsionnelle du système (PSF). Dans une approche bayésienne, on peut écrire :

$$P(o/i) = P(i/o)P(o)/P(i), \quad (2)$$

où  $P(o/i)$  représente la fonction de densité de probabilité (*pdf*) de l'objet " $o$ " sachant " $i$ ". Le terme  $P(o)$  désigne la densité de probabilité (*pdf*) de l'image réelle et  $P(i/o)$  représente la probabilité *a priori*.

Si nous considérons un modèle Poissonien pour la formation de l'image, chaque pixel de l'image  $x$  peut être vu comme une variable aléatoire de Poisson. Ainsi pour tous les pixels d'une image, la *pdf* est le produit des densités de chaque pixel considéré séparément si et seulement s'ils sont indépendants.

La *pdf* d'une variable aléatoire de Poisson est donnée par l'expression suivant :

$$P(x) = \frac{\lambda^x \exp(-\lambda)}{x!}, \quad (3)$$

où  $\lambda$  est le paramètre qui régit l'arrivée des photons par unité de temps et par unité de pixel.

Dans ces conditions, on peut établir la relation suivante :

$$p(I/O) = \prod_{x,y} \frac{[(h^* O)(x, y)]^{i(x,y)} \exp\{- (h^* O)(x, y)\}}{I(x, y)!} \quad (4)$$

Cette relation représente la fonction de vraisemblance de l'image observée  $I$  conditionnelle à l'image source  $O$ .

Une des solutions pour résoudre cette équation (4) est de la maximiser. Le maximum n'étant pas affecté par une transformation logarithmique et la maximisation revient à minimiser le moins du logarithme, l'expression peut être simplifiée en prenant son logarithme :

$$-\ln(p(I/O)) = \iint [(h^* o)(x, y) - i(x, y) \cdot \ln(h^* o)(x, y) + \ln(i(x, y)!)] dx dy \quad (5)$$

Le terme  $\ln(i(x, y)!)$  est constant relativement à  $o$ . Ce qui permet à partir de l'équation (5) de définir une nouvelle fonction à minimiser :

$$-\ln(p(I/O)) = \iint [(h^* o)(x, y) - i(x, y) \cdot \ln(h^* o)(x, y)] dx dy \quad (6)$$

Le minimum est ensuite obtenu en annulant la dérivée du logarithme de  $-p(I/O)$  par rapport à  $O$ , c'est-à-dire :

$$\frac{-\partial \ln p(I/O)(x, y)}{\partial O(x, y)} = 0, \quad (7)$$

On obtient :

$$\frac{-\partial \ln(p(I/O))}{\partial O(x, y)} = \frac{-\partial}{\partial O(x, y)} \left\{ \iint [(h^* o)(x, y) - i(x, y) \cdot \ln(h^* o)(x, y)] dx dy \right\} = 0, \quad (8)$$

$$\frac{-\partial \ln(p(I/O))}{\partial O(x, y)} = \frac{-\partial}{\partial O(x, y)} \left\{ \iint (h^* o)(x, y) dx dy - \iint i(x, y) \cdot \ln(h^* o)(x, y) dx dy \right\} = 0. \quad (9)$$

Il en résulte :

$$\frac{i(x, y)}{(h^* o)(x, y)} * h(-x, -y) - \iint h(-x, -y) dx dy = 0 \quad (10)$$

où  $h(-x, -y)$  est le conjugué de  $h(x, y)$ .

En supposant que la réponse impulsionnelle est normalisée à 1 (cela peut être justifié par la conservation de l'énergie), alors  $\iint h(-x, -y) dx dy = 1$ . Ce qui donne :

$$\frac{i(x, y)}{(h * o)(x, y)} * h(-x, -y) - 1 = 0 \quad , \quad (11)$$

$$\frac{i(x, y)}{(h * o)(x, y)} * h(-x, -y) = 1 \quad . \quad (12)$$

La résolution de l'équation (12) par une approche multiplicative, permet de déduire

l'algorithme suivant en supposant qu'à convergence, le ratio :  $\frac{o_{n+1}(x, y)}{o_n(x, y)} = 1$ ,

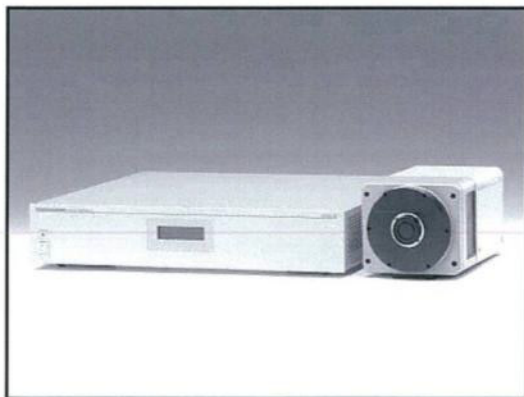
$$o_{n+1}(x, y) = o_n(x, y) \left[ \frac{i(x, y)}{(h * o)(x, y)} * h(-x, -y) \right] . \quad (13)$$

# Annexe B

## HAMAMATSU DATA SHEET

512 × 512 pixels BT(back-thinned) CCD

### BT(Back-thinned)-CCD Cooled Digital Camera ORCA II -BT-512



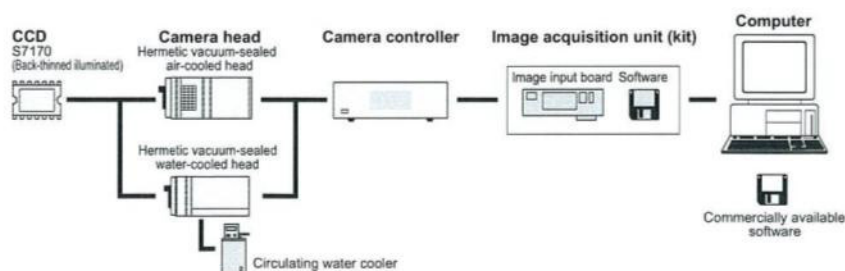
▲ Hermetic vacuum sealed air-cooled head type

The ORCA II -BT-512 features an original and unique Hamamatsu S7170 CCD chip packaged in a proprietary permanently sealed vacuum chamber evacuated to  $10^{-7}$  Torr. This high resolution, back thinned, back illuminated CCD offers very high quantum efficiency over the spectrum from 200 nm to 1000 nm. With a huge full well capacity, low read noise and MPP (Multi-Pinned Phase) technology in the drive circuits to reduce dark current, this camera will produce rapid exposures and very high dynamic range images. Dual mode digitization offers a software selectable choice of speed or very low noise readout methods with 12 bit to 16 bit precision. Special analog contrast enhancement circuits increase versatility for even the most difficult imaging conditions.

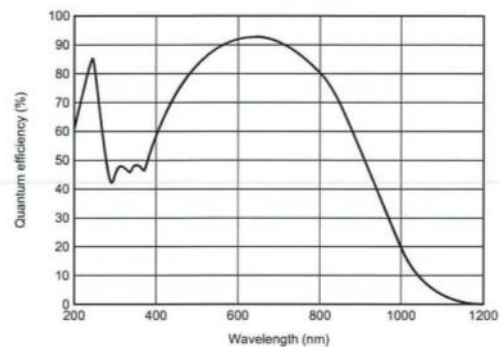
#### APPLICATIONS

- Luminescence and Fluorescence
- Video microscopy
- Semiconductor imaging
- X-ray applications
- Neutron radiography
- Scintillator readout

#### SYSTEM CONFIGURATION



#### SPECTRAL RESPONSE CHARACTERISTIC



\* This is typical, not guaranteed.

#### FEATURES

- High resolution format (512 × 512 pixels)
- High quantum efficiency from UV to NIR
- Very large full well capacity (230000 electrons typ.)
- Low readout noise design (8 electrons r.m.s. typ.)
- Software selectable dual digitizers
- Analog contrast enhancement

#### TYPE NUMBER

C4742-98-26L

Cooling method  
A: Air-cooling  
W: Water-cooling



## SPECIFICATIONS

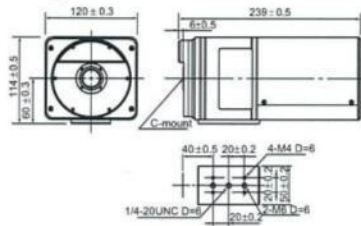
Type number	C4742-98-26LA	C4742-98-26LW
Camera head type	Hermetic vacuum sealed air-cooled head	Hermetic vacuum sealed water-cooled head
Circulating water cooler (sold separately)	-	Required
Mechanical shutter	Built-in (Control: OPEN / CLOSE / AUTO)	
Imaging device	S7170 full-frame transfer CCD	
Effective no. of pixels	512 (H) × 512 (V)	
Cell size	24 μm (H) × 24 μm (V)	
Effective area	12.29 mm (H) × 12.29 mm (V)	
Pixel clock rate	156 kHz/pixel (High-precision readout) / 2.5 MHz/pixel (High-speed readout)	
Frame rate	0.5 frame/sec (High-precision readout) / 7.0 frame/sec (High-speed readout)	
Readout noise (r.m.s.) (High-precision readout)	8 electrons (typ.) / 6 electrons (min.)	
Full well capacity	230000 electrons	
Dynamic range* (High-precision readout)	28750 : 1 (typ.) / 38333 : 1 (max.)	
Cooling method	Peltier cooling / forced-air-cooling + hermetic sealing	Peltier cooling / water-cooling + hermetic sealing
Cooling temperature	-55 °C	-60 °C
Dark current	0.8 electrons/pixel/s	0.3 electrons/pixel/s
A/D converter (High-precision readout)	16 bit	
Output signal (High-precision readout)	RS-422A 16 bit parallel output	
Exposure time	20 ms or more	
External control	RS-232C	
Sub-array	Yes	
External trigger	Yes	
Contrast enhancement	1, 4, 16 times (High-precision readout) / 1 to 6 times (High-speed readout)	
Lens mount	C-mount	
Line voltage	AC 100 V / AC 117 V / AC 220 V / AC 240 V, 50 Hz/60 Hz	
Power consumption	approx. 220 V·A	
Ambient storage temperature	-10 °C to +50 °C	
Ambient operating temperature	0 °C to +40 °C	
Ambient operating/storage humidity	70 % max. (with no condensation)	

Binning	Frame rate					Subarray	Frame rate	
	1 × 1	2 × 2	4 × 4	8 × 8	High-precision readout		High-speed readout	
High-precision readout	6.34 frame/s	9.84 frame/s	13.6 frame/s	16.8 frame/s	256 × 256	9.84 frame/s	13.6 frame/s	
High-speed readout	0.55 frame/s	1.07 frame/s	2.05 frame/s	3.75 frame/s	128 × 128	1.86 frame/s	5.17 frame/s	

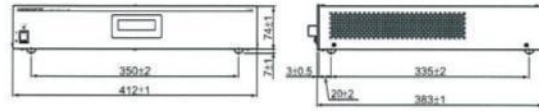
\* Calculated from the ratio of the full well capacity and the readout noise.

## DIMENSIONAL OUTLINES (Unit: mm)

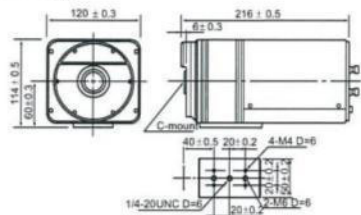
- Hermetic vacuum sealed air-cooled head (approx. 2.5 kg)



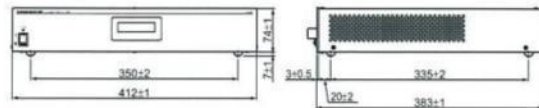
- Camera controller (approx. 8.5 kg)



- Hermetic vacuum sealed water-cooled head (approx. 2.5 kg)



- Camera controller (approx. 8.5 kg)



- ★ Product and software package names noted in this documentation are trademarks or registered trademarks of their respective manufacturers.
- Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office.
- Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions. Specifications and external appearance are subject to change without notice.

© 2001 Hamamatsu Photonics K.K.

# HAMAMATSU

Homepage Address <http://www.hamamatsu.com>

HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Systems Division

812 Joko-cho, Hamamatsu City, 431-3196, Japan, Telephone: (81)53-431-0124, Fax: (81)53-435-1574, E-mail: [export@sys.hpk.co.jp](mailto:export@sys.hpk.co.jp)

U.S.A. and Canada: Hamamatsu Photonic Systems: 360 Foothill Road, Bridgewater, N.J. 08807-0910, U.S.A., Telephone: (1)908-231-1116, Fax: (1)908-231-0852, E-mail: [usa@hamamatsu.com](mailto:usa@hamamatsu.com)

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH: Arzbergerstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49)8152-375-0, Fax: (49)8152-2658, E-mail: [info@hamamatsu.de](mailto:info@hamamatsu.de)

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L.: 8, Rue du Saule Trapu, Parc du Moulin de Massy, 91882 Massy Cedex, France, Telephone: (33)1 69 53 71 00, Fax: (33)1 69 53 71 10, E-mail: [infos@hamamatsu.fr](mailto:infos@hamamatsu.fr)

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited: 2 Howard Court, 10 Tewin Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 1BW, U.K., Telephone: (44) 1707-294888, Fax: (44) 1707-325777, E-mail: [info@hamamatsu.co.uk](mailto:info@hamamatsu.co.uk)

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB: Smidesvägen 12, SE-171-41 Solna, Sweden, Telephone: (46)8-509-031-00, Fax: (46)8-509-031-01, E-mail: [info@hamamatsu.se](mailto:info@hamamatsu.se)

Italy: Hamamatsu Photonics Italia S.R.L.: Strada della Moia, 1/E 20020 Arese (Milano), Italy, Telephone: (39)02-935 81 733, Fax: (39)02-935 81 741, E-mail: [info@hamamatsu.it](mailto:info@hamamatsu.it)

Cat. No. SICS1091E04  
SEP/2004 HPK  
Created in Japan (PDF)

**M. Smaïl AKKOUL**

## **Filtrage et déconvolution en imagerie de bioluminescence chez le petit animal**

### **Résumé :**

Cette thèse est consacrée au traitement d'images de bioluminescence chez le petit animal. Ce type d'imagerie, bien qu'utilisé en routine pour la recherche en cancérologie par exemple, présente néanmoins des problèmes liés aux phénomènes de diffusion et d'absorption par les tissus internes à l'animal. Il s'ajoute à cela le bruit du système d'acquisition ainsi que le bruit lié aux rayonnements cosmiques. Ceci influe sur la qualité des images acquises et rend leur exploitation délicate. Le but de cette thèse est de compenser ces effets perturbateurs. Les travaux menés ont abouti à la proposition d'un modèle de formation des images de bioluminescence ainsi qu'à une chaîne de traitement adaptée composée d'une étape de filtrage suivie d'une étape de déconvolution. Après étude de la nature des différents bruits liés à l'acquisition, nous avons mis au point un nouveau filtre médian pour la suppression du bruit impulsionnel aléatoire présent sur les images acquises ; ce filtre représente le premier bloc de la chaîne proposée. Pour l'étape de déconvolution, nous avons mené une étude comparative de différents algorithmes de déconvolution. Cela a conduit à choisir un algorithme de déconvolution aveugle initialisé avec la réponse impulsionnelle estimée du système d'acquisition. Nous avons validé notre approche globale en comparant les résultats à la réalité terrain. Au travers de différents essais cliniques, nous avons montré que le traitement que nous proposons permet une amélioration significative de la mesure des sources bioluminescentes et une meilleure distinction de sources très proches, ce qui représente un apport non négligeable pour les utilisateurs d'images de bioluminescence.

Mots clés : Imagerie par bioluminescence, petit animal, filtrage, déconvolution

## **Filtering and deconvolution for bioluminescence imaging of small animals**

### **Summary:**

This thesis is devoted to the analysis of bioluminescence images applied to the small animal. This kind of imaging modality is used in cancerology studies. Nevertheless, some problems are related to the diffusion and the absorption of the tissues of the light of internal bioluminescent sources. In addition, system noise and the cosmic rays noise are present. This influences the quality of the images and makes it difficult to analyze. The purpose of this thesis is to overcome these disturbing effects. We first have proposed an image formation model for the bioluminescence images. The processing chain is constituted by a filtering stage followed by a deconvolution stage. We have proposed a new median filter to suppress the random value impulsive noise which corrupts the acquired images; this filter represents the first block of the proposed chain. For the deconvolution stage, we have performed a comparative study of various deconvolution algorithms. It allowed us to choose a blind deconvolution algorithm initialized with the estimated point spread function of the acquisition system. At first, we have validated our global approach by comparing our obtained results with the ground truth. Through various clinical tests, we have shown that the processing chain allows a significant improvement of the spatial resolution and a better distinction of very close tumor sources, what represents considerable contribution for the users of bioluminescence images.

Keywords: Bioluminescence imaging, small animal, filtering, deconvolution