



**HAL**  
open science

# Alignement-reconstruction simultanée de tomogramme électronique et extraction de volume de ribosome

Hmida Rojbani

► **To cite this version:**

Hmida Rojbani. Alignement-reconstruction simultanée de tomogramme électronique et extraction de volume de ribosome. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université de Strasbourg; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), 2016. Français. NNT: 2016STRAD045 . tel-01552672

**HAL Id: tel-01552672**

**<https://theses.hal.science/tel-01552672>**

Submitted on 3 Jul 2017

**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 DE STRASBOURG



UNIVERSITÉ DE TUNIS EL MANAR



*ÉCOLE DOCTORALE Mathématiques, Sciences de l'information et de l'ingénieur*

*ICube-Laboratoire des sciences de l'ingénieur, de l'informatique et de l'imagerie UMR 7357*

**THÈSE** présentée par :

**Hmida ROJBANI**

soutenue le : **28 Novembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg et l'université de Tunis El Manar**

Discipline/ Spécialité : Informatique

**Alignement-reconstruction simultanée  
de tomogramme électronique et  
extraction de volume de ribosome**

**THÈSE dirigée par :**

**M. Christian Ronse**

**M. Khaled Bsaïes**

Professeur, Université de Strasbourg

Professeur, Université de Tunis El Manar

**RAPPORTEURS :**

**Mme. Dorra Sellami Masmoudi**

**M. Nicolas Passat**

**M. Charles Kervrann**

Professeur, Université de Sfax

Professeur, Université Reims-Champagne-Ardenne

Directeur de recherches, INRIA-Rennes

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. Imed Riadh Farah**

**M. Étienne Baudrier**

**M. Atef Hamouda**

Professeur, Université de Manouba

Maître de conférences, Université de Strasbourg

Maître assistant, Université de Tunis El Manar



## Résumé

Ce travail de thèse aborde le problème de l'alignement d'images 2D obtenues en tomographie électronique dans la perspective d'une reconstruction tridimensionnelle et la détection des ribosomes à partir de l'objet reconstruit. Une méthode d'optimisation globale est proposée pour minimiser un coût qui permet d'effectuer l'alignement 3D et la reconstruction de manière conjointe. La thèse traite également le problème de la segmentation des images 3D reconstruites avec une méthode de classification probabiliste. Cependant, la nature des images de cryo-tomographie révèle des problèmes de bruit et de contraste. Deux méthodes de filtrage 3D ont été proposées comme prétraitement du processus de segmentation. La première méthode est basée sur l'intégration fractionnaire. La seconde est basée sur l'analyse multi-fractale. L'institut de recherche biomédicale IGBMC de Strasbourg a fourni les images de projection utilisées dans cette thèse.

**Mots clés :** Tomographie électronique, Orientations erronées, Optimisation, 3D, Analyse multi-fractale, Intégration fractionnaire.

## Abstract

This thesis deals with the problem of the alignment of 2D images obtained by transmission electron microscopy in the perspective of a three-dimensional reconstruction and the detection of ribosomes from the reconstructed object. A global optimization method is proposed to minimize a cost that allows the 3D alignment and reconstruction to be carried out jointly. The thesis also deals with the problem of segmentation of reconstructed 3D images with a probabilistic classification method. However, the nature of cryo-tomography images reveals noise and contrast problems. For this reason, two methods of 3D filtering have been proposed as pre-processing of segmentation, one is based on fractional integration, and the other on a multi-fractal analysis. The institute of biomedical research IGBMC in Strasbourg provides the projection images used in this thesis.

**Keywords :** Electronic Tomography, Incorrect Orientations, Optimization, 3D, Multi-fractal analysis, Fractional integration.

## ملخص

هذه الأطروحة تتناول مشكلة رصف الصور ثنائية الأبعاد التي تحصلنا عليها من المجهر الإلكتروني في منظور إعادة التشكيل ثلاثي الأبعاد والكشف عن الريبوسومات في صورة المعادة بناؤها. في هذا السياق نقترح طريقة تحسين شامل لتقليل التكلفة التي تسمح برصف ثلاثي الأبعاد وإعادة التشكيل في الوقت ذاته. تتناول الأطروحة أيضا مشكلة تقسيم الصور ثلاثية الأبعاد حسب طريقة تصنيف احتمالي. ومع ذلك، فإن الصور التصوير البارد المقطعي تحتوي على الضوضاء ومشكلة حدة الألوان. لهذا السبب، تم اقتراح طريقتين لتصفية ثلاثية الأبعاد قبل مرحلة تجزئة، الطريقة الأولى تقوم على التكامل الجزئي، والآخر على تحليل متعدد الكسور. معهد البحوث الطبية الحيوية IGBMC في ستراسبورغ وفر لنا صور الإسقاط المستخدمة في هذه الأطروحة.

**الكلمات المفاتيح:** التصوير المقطعي الإلكتروني، الاتجاهات الخاطئة، تحسين شامل، ثلاثي الأبعاد، التكامل الجزئي، تحليل متعدد الكسور.



# Dédicaces

**E**N témoignage de ma gratitude, de mon amour et de ma grande reconnaissance, je dédie ce travail à :

Ma mère Fatma pour son amour, sa confiance en moi et ses prières qui ont illuminé mon chemin,

Mon père Abdel Hamid pour son soutien illimité et pour la confiance qu'il a mise en moi,

Ma soeur Mouna, merci d'être toujours à mes côtés ma chère,

Toute la famille Naouai, Toute la famille Sellaout, Mes amis,

Mes enseignants à la Faculté des Sciences de Tunis, Toutes les personnes qui ont fait de moi ce que je suis maintenant. Tous les gens que j'aime.

*Valar Morghulis*

---

# Remerciements

**C'**EST avec un grand plaisir que je réserve cette page en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier, M. **Nicolas Passat**, Professeur à l'Université Reims Champagne-Ardenne, Mme. **Dorra Sellami Masmoudi**, Professeur à l'Université de Sfax, M. **Charles Kervrann** Directeur de recherches à INRIA-Rennes et M. **Imed Riadh Farah**, Professeur à l'Université de la Manouba, de me faire l'honneur d'avoir bien voulu juger et évaluer mon travail.

Je remercie aussi mon directeur de thèse à la Faculté des sciences de Tunis, Professeur **Khaled Bsaïes** pour ses conseils et directives généreusement donnés et pour l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail.

J'exprime également ma gratitude à mon directeur de thèse à l'Université de Strasbourg, Professeur **Christian Ronse**, pour son aide si précieuse, ses consignes et ses encouragements qui ont poussé en avant mes travaux de recherche.

Mes vifs remerciements s'adressent également à mon co-encadrant M. **Étienne Baudrier**, Maître de Conférences à l'Université de Strasbourg, sa rigueur scientifique et ses précieux conseils tout au long de mes recherches m'ont beaucoup inspirés. Ils ont été et resteront les moteurs de mon travail de chercheur.

Je tiens à exprimer mon respect, ma gratitude et mes plus chaleureux remercie-



*ments à M. **Atef Hamouda**, Maître Assistant à la Faculté des Sciences de Tunis, pour avoir été mon co-encadrant de thèse, mais pas que ! Encadrant récidiviste, puisqu'il a également mené au succès mes travaux de Mastère. Je le remercie pour ses conseils qui m'ont été d'une grande valeur, sa manière délicieuse de donner envie de faire de la recherche, aussi pour ses qualités humaines. Merci de m'avoir soutenu, d'avoir toujours cru en moi.*

*Je tiens à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, particulièrement M. **Benoît Naegel** et M. **Loïc Mazo**.*

*Un grand merci à **Mohamed Naouai**, **Aymen Sellaouti**, **Inès Riahi**, **Sahar Ben Aicha**, **Sawssen Jalel** pour ses soutiens continu et pour ses amitiés.*

---

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>v</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>1 Contexte et problématique</b>	<b>5</b>
1.1 Historique . . . . .	6
1.2 Microscope électronique . . . . .	6
1.3 Interaction électron-matière . . . . .	7
1.4 Microscopie électronique en transmission (MET) . . . . .	9
1.4.1 Mode diffraction . . . . .	9
1.4.2 Mode image . . . . .	10
1.4.3 Mécanismes de formation du contraste . . . . .	12
1.5 Limitations du MET . . . . .	13
1.5.1 Effets des radiations ioniques . . . . .	13
1.5.2 Taille du spécimen . . . . .	15
1.5.3 Projections manquantes . . . . .	15
1.6 Tomographie électronique . . . . .	17
1.6.1 Approche théorique . . . . .	18
1.6.2 Géométrie d'acquisition . . . . .	20

1.6.3	Alignement . . . . .	21
1.6.4	Fonction de transfert de contraste . . . . .	22
1.6.5	Reconstruction . . . . .	24
1.7	Analyse du tomogramme . . . . .	24
1.8	Problématique . . . . .	26
<b>2</b>	<b>Reconstruction tomographique : état de l'art</b>	<b>32</b>
2.1	Alignement des images de projection . . . . .	33
2.1.1	Méthode d'alignement par marqueurs . . . . .	33
2.1.2	Méthode d'alignement par corrélation croisée . . . . .	35
2.1.3	Alignement intégré au processus de reconstruction . . . . .	38
2.2	Reconstruction 3D . . . . .	40
2.2.1	Reconstruction analytique . . . . .	41
2.2.2	Reconstruction algébrique . . . . .	47
<b>3</b>	<b>Alignement et reconstruction 3D par optimisation simultanée</b>	<b>62</b>
3.1	Réduction de l'incertitude angulaire et l'amélioration de la reconstruction 3D par coupe . . . . .	63
3.1.1	Dérivée partielle par rapport à $\mathbf{f}$ . . . . .	66
3.1.2	Dérivée partielle par rapport à $\Theta$ . . . . .	67
3.1.3	Algorithme de raffinement . . . . .	67
3.1.4	Optimisation tridimensionnelle par coupes 2D . . . . .	68
3.2	Alignement et reconstruction 3D multi-échelle conjointe pour cryo tomographie électronique . . . . .	70
3.2.1	Transformations géométriques . . . . .	71
3.2.2	Fonction de coût 3D globale . . . . .	73
3.2.3	Accélération de l'optimisation via la méthode multi-échelle . . . . .	76

---

3.2.4	Algorithme d'alignement et reconstruction 3D multi-échelle .	77
3.3	Évaluation . . . . .	79
3.3.1	Mesures d'évaluation . . . . .	79
3.3.2	Cas 2D . . . . .	84
3.3.3	Cas 3D par coupes . . . . .	89
3.3.4	Cas 3D globale . . . . .	94
<b>4</b>	<b>Segmentation tomographique : état de l'art</b>	<b>99</b>
4.1	Réduction de bruit . . . . .	102
4.1.1	Type de bruit . . . . .	103
4.1.2	Filtres linéaires . . . . .	103
4.1.3	Filtres non-linéaires . . . . .	104
4.1.4	Évaluation des algorithmes de filtrage . . . . .	108
4.2	Segmentation tomographique . . . . .	111
4.2.1	Contours actifs (modèle <i>snake</i> ) . . . . .	112
4.2.2	Ligne de partage des eaux ( <i>watershed</i> ) . . . . .	113
4.2.3	Approche hybride : <i>watersnake</i> . . . . .	114
4.2.4	Segmentation par vecteurs propres . . . . .	115
4.2.5	Segmentation par patches . . . . .	115
4.2.6	Segmentation par seuillage . . . . .	116
4.2.7	Segmentation par seuillage à l'aide des projections réelles . .	116
4.2.8	Évaluation des algorithmes de segmentaion . . . . .	117
<b>5</b>	<b>Extraction des ribosomes à partir de l'objet 3D reconstruit</b>	<b>121</b>
5.1	Contraste de l'image tomographique . . . . .	121
5.2	Filtrage de l'image tomographique . . . . .	123
5.2.1	Texture . . . . .	123

---

5.2.2	Méthodes proposées pour le débruitage . . . . .	126
5.2.3	Tests . . . . .	140
5.3	Classification de l'image reconstruite . . . . .	145
5.3.1	Définition des classes . . . . .	146
5.3.2	Choix du classifieur . . . . .	146
5.3.3	Classifieur probabiliste . . . . .	148
5.4	Application sur l'image brute . . . . .	150
5.5	Classification sur l'image tomographique . . . . .	152
5.5.1	Classification brute . . . . .	152
5.5.2	Classification avec l'intégration fractionnaire . . . . .	153
5.5.3	Classification avec l'analyse multifractale . . . . .	154
5.6	Extraction du ribosome du volume 3D . . . . .	156
5.6.1	Approche . . . . .	156
5.6.2	Évaluation . . . . .	157
	<b>Conclusion et Perspectives</b>	<b>162</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>165</b>
	<b>Acronymes</b>	<b>190</b>
<b>A</b>	<b>Analyse multi-fractale</b>	<b>192</b>
A.1	Construction de la mesure multi-fractale . . . . .	192
A.1.1	Calcul de la mesure stationnaire . . . . .	192
A.2	Exposant de singularité . . . . .	194
A.3	Décomposition en sous-ensembles . . . . .	195

---

# Table des figures

1.1	Diffusion élastique et inélastique entre un électron incident de haute énergie et un atome [Col98]. . . . .	7
1.2	Microscope électronique en transmission (MET)[Col98]. . . . .	8
1.3	Micrographies du microscope de bobines d'ADN marquées par des particules d'or; (A) en champ clair et (B) en champ sombre . Le contraste vu dans la partie A est inverse à la partie B. La différence de contraste entre CC et CS peut par exemple être observé sur le lieu marqué par une flèche [Gir10]. . . . .	11
1.4	Différence entre le contraste et l'intensité. ( $I_1$ et $I_2$ ) présentent les niveaux d'intensité et ( $\Delta I$ ) définit le contraste. . . . .	12
1.5	Différentes méthodes de fixation. . . . .	13
1.6	Images d'une tranche de cellule eucaryote obtenu par cryo-fixation. . . . .	14
1.7	Illustration de l'échantillonnage des données dans l'espace de Fourier. . . . .	16
1.8	Images reconstruites présentant des artefacts dus aux angles manquants [Tra13]. . . . .	16
1.9	Étapes successives du processus de reconstruction 3D tomographique. . . . .	17
1.10	Projection de Radon selon des rayons parallèles [WL06]. . . . .	19
1.11	Géométrie d'acquisition : seul axe vs double axe. . . . .	21
1.12	Fonction de transfert de contraste des images de projections [OS11]. . . . .	23

1.13	Exemple de faible alignement par corrélation croisée. . . . .	28
1.14	Représentation du porte-objet d'un MET [Col98]. . . . .	29
1.15	Le mécanisme d'un microscope MET . . . . .	30
2.1	Le processus de l'alignement par corrélation croisée. . . . .	36
2.2	Le processus de la méthode de raffinement par [YNP05]. . . . .	39
2.3	Représentation graphique du théorème de la coupe centrale [Kin05].	43
2.4	Échantillonnage du domaine des fréquences, avec une région plus étroite autour de l'origine échantillonnée [Mez12]. . . . .	44
2.5	Différentes grilles de la transformée de Fourier modifiée : de gauche à droite polaire, linogram, psuedo polaire. . . . .	45
2.6	Rétroprojection directe (à gauche : acquisition, à droite : recons- truction avec présence d'artefacts en étoile autour du pixel central) [Tra13] . . . . .	46
2.7	Représentation du filtre rampe . . . . .	46
2.8	L'interprétation du coefficient de poids de projection $w_{ij}$ d'un voxel.	49
2.9	Les différentes méthodes pour créer une matrice de projection. . . .	51
2.10	Déroulement de l'algorithme de SIRT. . . . .	55
2.11	Reconstruction avec les algorithmes de l'état de l'art. . . . .	60
3.1	Processus du gradient conjugué . . . . .	65
3.2	Projection du volume 3D. . . . .	69
3.3	Correction des paramètres de la transformation géométrique et amé- lioration du modèle 3D reconstruit par l'aspect multi-échelle pyra- midal. . . . .	77
3.4	Effet de la résolution de pixel. . . . .	82
3.5	Réduction de la résolution après la reconstruction avec SIRT (100 itération) et $n_\theta = 71$ . . . . .	83

3.6	Les résultats de reconstruction et d'optimisation sur une image fantôme du Sheep-Logan avec des erreurs d'orientations de variance de 1,5. . . . .	85
3.7	L'amélioration d'erreur entre les orientations initiales et celles corrigées pour la figure 3.6(c). . . . .	87
3.8	Les images testées. . . . .	87
3.9	la MCO et la corrélation moyennes (cas 2D). . . . .	87
3.10	La correction des orientations suivant différentes variances d'erreurs, pour différents nombres d'orientations (cas 2D). . . . .	88
3.11	La correction des images suivant différentes variances d'erreurs, pour différents nombres d'orientations (cas 2D). . . . .	88
3.12	Les images 3D de test. . . . .	90
3.13	La MCO moyenne et la corrélation moyenne (cas 3D par coupes). . . . .	90
3.14	La correction des orientations suivant différentes variances d'erreurs, pour différents nombres d'orientations (cas 3D par coupes). . . . .	91
3.15	La correction des images suivant différentes variances d'erreurs, pour différents nombres d'orientations (cas 3D par coupes). . . . .	91
3.16	Les projections de orf parapoxvirus respectivement suivant les angles $-60^\circ$ , $-40^\circ$ , $-10^\circ$ , $20^\circ$ , et $50^\circ$ . . . . .	92
3.17	L'EQMN entre les objets reconstruits (respectivement ses projections) par différentes méthodes et l'objet reconstruit par les experts (respectivement les projections réelles). . . . .	92
3.18	Une coupe d'objets reconstruits par différentes méthodes. . . . .	93
3.19	Temps d'exécution moyen direct et multi-échelle. . . . .	95
3.20	Reconstruction d'Orf-parapoxvirus : (a) par notre méthode; (b) reconstruction après l'alignement par la méthode proposée dans [PMV03]; (c) le volume reconstruit de référence. . . . .	96
3.21	Quelques projections des cellules eucaryotes. . . . .	97



---

3.22	Coupes de l'objet 3D reconstruit. . . . .	97
3.23	Objet 3D reconstruit seuillé. . . . .	97
4.1	La synthèse des protéines de sécrétion. Notez les structures denses circulaires (les ribosomes) sur la membrane [Bio12]. . . . .	100
4.2	Une coupe de l'image tomographique des cellules eucaryotes. . . . .	109
4.3	Les filtres linéaires. . . . .	109
4.4	Les filtres non linéaires. . . . .	110
4.5	L'algorithme <i>snake</i> . . . . .	118
4.6	L'algorithme <i>watershed</i> . . . . .	118
4.7	Segmentation par seuillage. . . . .	119
5.1	Qualité de l'image tomographique . . . . .	122
5.2	Signal non stationnaire de l'image de projection de la figure 5.1. . . . .	125
5.3	Huit modèles de direction [CCX12]. . . . .	129
5.4	Application de l'intégration sur l'image tomographique. . . . .	131
5.5	18-connexité (par voxels). . . . .	132
5.6	Application de l'intégration 3D sur l'image tomographique. . . . .	133
5.7	Diagramme d'estimation des coefficients de singularités. . . . .	136
5.8	Application de l'analyse multi-fractale sur l'image tomographique. . . . .	137
5.9	Décomposition 3D d'ondelette. . . . .	138
5.10	Application de l'analyse multi-fractale 3D sur l'image tomographique. . . . .	139
5.11	Allure de l'ondelette lorentzienne 3D. . . . .	140
5.12	Carte topographique de l'image tomographique avant et après filtrage. . . . .	141
5.13	Protocole d'ajout du bruit. . . . .	143
5.14	Performance des différentes approches contre le bruit mixte Poisson- gaussien en cas 2D. . . . .	144

---

5.15	Performance des différentes approches contre le bruit mixte Poisson-gaussien en cas 3D. . . . .	145
5.16	Zone d'apprentissage du ribosome. . . . .	146
5.17	La probabilité de l'observation $x$ pour chaque classe $C_i$ . . . . .	151
5.18	Zones d'apprentissage de l'image brute. . . . .	151
5.19	Histogramme des zones d'apprentissage des classes de la figure.5.18. . . . .	152
5.20	Classification d'une coupe 2D de l'objet reconstruit. . . . .	153
5.21	Histogramme des zones d'apprentissage des classes après l'intégration. . . . .	154
5.22	Filtrage de la coupe 2D par l'intégration fractionnaire et sa classification. . . . .	154
5.23	Histogramme des zones d'apprentissage des classes après l'analyse multi-fractale. . . . .	155
5.24	Filtrage de la coupe 2D par l'analyse multi-fractale et sa classification. . . . .	155
5.25	Architecture de notre système de reconstruction et classification 3D . . . . .	157
5.26	Superposition d'une coupe de l'image des ribosomes avec le masque donné par l'expert. . . . .	158
5.27	Extraction de ribosomes de l'objet 3D à partir de l'image reconstruite. . . . .	160
A.1	Allure de l'ondelette lorentzienne par rapport à l'ondelette gaussienne. . . . .	194

---

# Liste des tableaux

3.1	Les résultats par VAR pour les données synthétiques 2D avec $n_\theta = 360$ . . . . .	86
3.2	Les résultats par VAR pour les données synthétiques 2D avec $n_\theta = 71$ . . . . .	86
3.3	Les résultats pour différentes erreurs de translation. . . . .	94
4.1	Moyenne de PSNR pour l'image tomographique des cellules eucaryotes 3D. . . . .	111
5.1	Débruitage des images avec différentes approches . . . . .	144
5.2	Évaluation du rappel et de la précision. . . . .	159

---

# Introduction générale

L'un des défis majeurs pour les chercheurs en biologie concerne l'étude des cellules biologiques dans leur milieu naturel et la compréhension de leurs structures internes.

La cryo-tomographie électronique (CTE) permet de reconstruire une structure 3D de l'échantillon, avec une résolution nanométrique à partir d'une série d'images 2D obtenues sous plusieurs angles d'inclinaison. Cette technique fait intervenir un microscope électronique en transmission (MET) et se base sur un processus d'intégration en épaisseur.

Il y a deux étapes importantes en CTE, à savoir la reconstruction du volume 3D et la reconnaissance des structures qui le composent :

- Reconstruction :

La reconstruction en CTE du volume à partir des images acquises repose sur les méthodes de reconstructions tomographiques classiques. Les principales limites de la reconstruction sont l'anisotropie due à la collecte incomplète des données, la fonction de transfert de contraste généralement mal calibrée, les problèmes d'imperfections de l'alignement des images de projections et de l'indexation angulaire. En effet, les projections sont obtenues en utilisant la capacité d'inclinaison du porte-objet du MET. Ces projections sont réalisées avec des erreurs géométriques dues aux limites mécaniques de ce porte-objet, à savoir, les déplacements nanométriques de l'échantillon sur le porte-objet, la proximité avec les lentilles magnétiques du MET. D'autre part, les données réelles de l'inclinaison mécanique du

porte-objet ne sont pas suffisamment maîtrisées, ce qui provoque une incertitude aux niveaux des angles d'inclinaison. La qualité des images obtenues constitue une des limites à la reconnaissance automatique des structures recherchées.

- Reconnaissance :

Cette étape est fort importante pour les experts qui aspirent à des méthodes automatiques d'extraction du contenu d'intérêt des images tomographiques pour le besoin d'analyse et d'interprétation. Quel que soit le domaine d'application, l'étape de reconnaissance correspond souvent à un processus complexe qui implique des connaissances expertes sur le contenu à reconnaître, des méthodes de segmentation, de classification et des fonctions de décision. Pour le cas particulier des images tomographiques biologiques, ce processus doit aussi prévoir un prétraitement sur les données initiales afin d'améliorer sa qualité. Cette qualité est en effet affectée par le principe même du système d'acquisition qui dépend de la méthode de fixation appliquée sur l'échantillon biologique et qui repose sur une faible dose d'électrons.

Ces deux étapes incontournables dans le traitement des images tomographiques sont au centre de notre travail, qui porte sur une modalité de microscopie utilisée par les biologistes de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg (IGBMC). Les images traitées par ces biologistes ne leur permettent pas de détecter directement les structures intéressantes ni de les quantifier de manière automatisée.

Nous visons à travers ce travail à proposer et développer une méthode permettant de reconnaître les structures d'intérêt élémentaires (essentiellement des ribosomes) présentes dans des images 3D provenant de cryo tomographie électronique.

La première partie de notre travail est orientée vers le processus d'acquisition et de reconstruction afin de corriger ses défauts. Après une étude des méthodes de reconstruction existantes et leurs domaines d'application, nous introduisons une fonction de coût tridimensionnelle qui traite d'une manière simultanée les corrections géométriques des erreurs d'acquisition et l'amélioration de la reconstruction de l'objet à l'aide d'une optimisation basée sur le gradient conjugué. L'avantage de

l'approche proposée est de corriger les transformations géométriques dans l'espace 3D où celles-ci ont eu lieu. Pour accélérer cette optimisation, un schéma multi-échelle a été proposé.

Malgré l'étape d'amélioration de la reconstruction, la qualité du volume reconstruit demeure non satisfaisante. De plus, les algorithmes usuels de débruitage et d'amélioration de contraste s'avèrent inefficaces, d'où l'importance de proposer une nouvelle approche tridimensionnelle afin d'améliorer la qualité et le contraste de l'image reconstruite. Dans la deuxième partie de ce travail, une étude a été orientée vers l'analyse multi-fractale, qui transforme l'image initiale en une image d'exposants de singularité (image Hölder). Ces exposants donnent une vue locale et une vue globale sur les voxels et permettent de renforcer l'homogénéité locale. L'application sur l'image tomographique a montré une bonne performance de l'analyse multi-fractale dans l'amélioration de la qualité de l'image reconstruite. Ceci nous a amené à exploiter l'image de Hölder résultante de l'analyse multi-fractale dans la phase de classification. Ainsi, nous proposons un processus de classification probabiliste supervisée basée sur une phase d'apprentissage, permettant de caractériser les zones d'intérêt dans l'image.

Les résultats d'extraction sont évalués par les experts de l'équipe de biologie structurale de l'IGBMC qui confirment l'apport des approches proposées dans l'amélioration de l'image initiale et la segmentation de l'image tomographique.

Le présent manuscrit introduit l'essentiel de nos travaux, détaille nos contributions dans chacune des deux parties de reconstruction et de reconnaissance. Il est structuré en cinq chapitres organisés comme suit :

- Le premier chapitre situe ce travail dans son contexte et introduit sa problématique. Il présente le cadre général de notre sujet, à savoir, l'acquisition microscopique, la tomographie électronique et l'interprétation de l'objet reconstruit.
- Le deuxième chapitre est dédié pour la reconstruction tomographique, il dresse un état de l'art détaillé sur les méthodes d'alignement et de reconstruction existantes ainsi qu'un bilan qui dégage leurs avantages et leurs limites.

- Le troisième chapitre est consacré à la description de notre approche de raffinement simultanée des transformations géométriques accompagnées de l'acquisition et la reconstruction de l'objet 3D en utilisant un schéma multi-échelle. Nous y évaluons notre approche avec une nouvelle métrique proposée.
- Le quatrième chapitre est consacré pour la phase de reconnaissance, il présente un état de l'art sur les approches de filtrage, de classification et de segmentation utilisées en tomographie électronique.
- Dans le dernier chapitre de ce rapport nous nous intéressons à l'extraction des ribosomes à partir de l'objet 3D reconstruit. Ainsi, nous exposons nos travaux de la phase de filtrage, nous présentons les deux approches tridimensionnelles, à savoir, l'intégration fractionnaire et l'analyse multifractale. Après le filtrage de l'image tomographique, nous introduisons notre approche de classification probabiliste pour l'extraction du ribosome et nous évaluons notre approche.

Nous terminons ce rapport par une conclusion et quelques perspectives pour des travaux futurs.

Chapitre

# 1

---

## Contexte et problématique

### Introduction

La cryo-tomographie électronique est une technologie d'imagerie permettant de visualiser des structures de cellules individuelles, des organites, des macromolécules souples et certains virus. Cette technique vise à estimer la densité électronique 3D d'un objet à partir d'une série d'images 2D de cet objet obtenues sous différents angles par microscopie électronique. Cette approche est similaire à la tomographie médicale (TM) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cependant, la résolution de la reconstruction des échantillons d'images microscopiques dans la cryo-tomographie électronique est nanométrique. Conceptuellement, on peut diviser la cryo-tomographie électronique en deux phases : l'acquisition de série d'images 2D et la reconstruction 3D. Dans cette thèse, nous traitons la phase de reconstruction. Cependant, puisque les principes de l'acquisition de séries d'images sont essentiels pour comprendre le fonctionnement de l'algorithme de reconstruction, nous allons les décrire brièvement dans ce chapitre. À cet effet, nous introduisons le concept de base du microscope électronique en transmission (MET) et ensuite, nous nous focalisons sur le microscope électronique et son système d'acquisition de l'image. Nous évoquons également les limitations du MET. Dans la dernière partie de ce chapitre, nous présentons le problème de la distribution de densité 3D lié au mi-



croscopie et la cryo-tomographie électronique.

## 1.1 Historique

L'histoire de la microscopie électronique remonte aux travaux de Louis De Broglie en 1929 [Bro29], qui a découvert que les électrons peuvent être traités comme une onde, d'où l'idée de les utiliser sous forme de faisceau lumineux dans un microscope. C'est à l'aide de ses travaux qu'Ernst Ruska mit en œuvre les premières lentilles électromagnétiques, qui ont été utilisées par la suite pour la mise en place du premier microscope électronique en 1931. En 1986, Ernst Ruska a reçu le prix Nobel suite à cette découverte [WC09]. Par la suite, plusieurs chercheurs de l'Université de Cambridge ont développé la théorie du contraste de diffraction électronique pour déterminer les structures de cristal des matériaux cristallins [HHW60]. Et c'est depuis les années 1970 que de nombreux METs ont été développés pour identifier, par imagerie à haute résolution, chaque atome d'une structure cristalline [WC09].

## 1.2 Microscope électronique

L'analyse des échantillons dans le microscope électronique dépend du type de microscope. Dans un microscope électronique à balayage (MEB), ce sont les faisceaux électroniques réfléchis à la surface d'un échantillon volumineux qui sont mesurés. Une image de cette surface est construite pixel par pixel en mesurant les électrons secondaires et rétrodiffusés. Dans un microscope électronique en transmission (MET), les faisceaux électroniques passent à travers l'échantillon mince. Ces faisceaux sont ensuite amplifiés par un ensemble de lentilles électromagnétiques afin de produire une image.

### 1.3 Interaction électron-matière

En raison de sa faible masse, l'électron peut être facilement dévié par le noyau ou les électrons de l'atome. La diffusion de particules dues à des interactions électrostatiques, appelées interactions de Coulomb, représente le processus principal utilisé dans les techniques d'imagerie MET. Il est important de noter que l'électron peut être traité de deux manières différentes [WC09] :

- comme une particule, dans la diffusion d'électrons,
- comme une onde, dans la diffraction d'électrons.

En outre, il existe principalement deux formes de diffusion ; élastique (pas de perte d'énergie) et inélastique (avec perte d'énergie) (*cf.* figure 1.1). Les deux formes sont utiles pour l'analyse des échantillons. Cependant, elles peuvent endommager le spécimen, et elles ne sont pas adéquates pour les matières biologiques. Par conséquent, que ce soit pour la diffusion élastique ou inélastique, elles limitent le potentiel de l'analyse de ces échantillons pour le MET [KEM08].

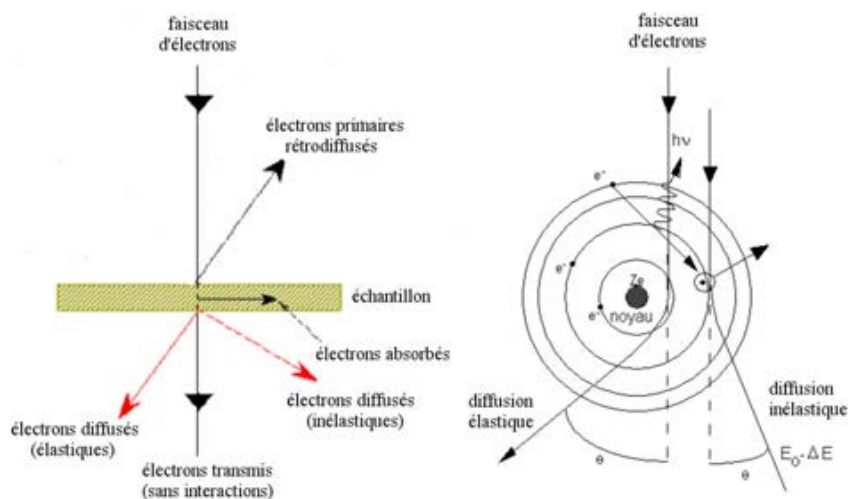


FIGURE 1.1 — Diffusion élastique et inélastique entre un électron incident de haute énergie et un atome [Col98].

Pour remédier à ce problème, il convient que l'échantillon soit préparé par une méthode de fixation. Il est important d'utiliser ou de développer une technique de préparation qui laisse les propriétés des échantillons étudiées, inchangées [Pet08]. Concernant l'échantillon biologique, une épaisseur de 100 nm est considérée comme appropriée pour l'imagerie à haute résolution. Néanmoins, une autre problématique pourrait également se poser. En effet, les conditions du vide du microscope ne permettent pas les échantillons contenant de l'eau. Dans la plupart des cas, les échantillons biologiques doivent être soit chimiquement fixés (en substituant l'eau, par exemple des polymères) ou bien séchés. Dans les deux cas, des changements significatifs de la morphologie et de la structure de l'échantillon sont susceptibles de se produire. Il est aussi important de noter que la Cryo-MET utilise des échantillons hydratés et produit ainsi des échantillons aussi près que possible de leur état natif, surtout si la vitrification de glace est obtenue [BN06].

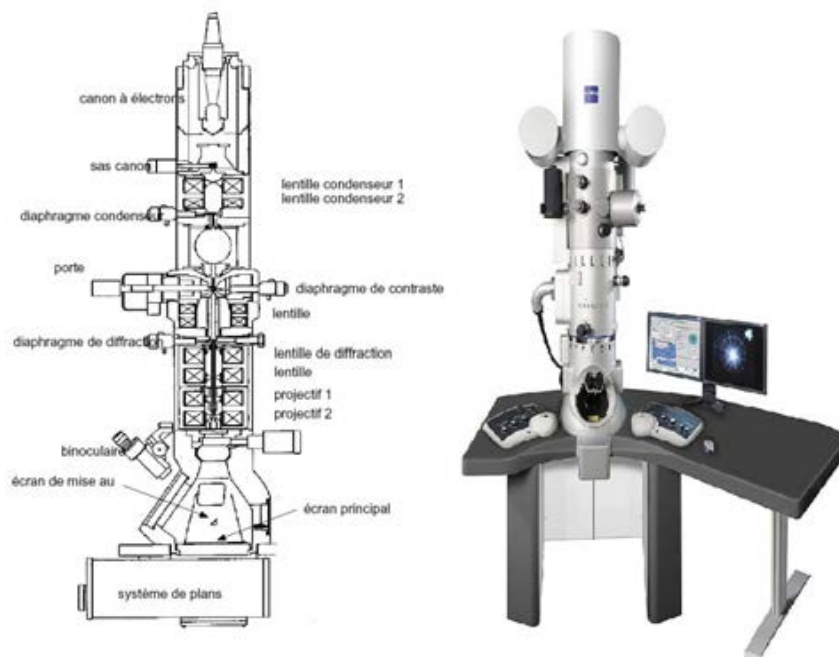


FIGURE 1.2 — Microscope électronique en transmission (MET)[Col98].

## 1.4 Microscopie électronique en transmission (MET)

Le processus d'acquisition d'image par un MET (*cf.* figure.1.2) est résumé comme suit [WC09] : les électrons sont émis par la source d'électrons située dans la partie supérieure de la colonne du microscope et ils sont accélérés vers l'échantillon à travers un potentiel électrique positif. Ceux-ci sont appelés électrons primaires. Avant de pénétrer l'échantillon, les faisceaux d'électrons sont condensés par les premières et secondes lentilles du condenseur, respectivement C1 et C2. Les deux lentilles ont des ouvertures connues sous le nom d'ouverture de condenseur qui servent à bloquer les électrons dont la propagation diverge des angles spécifiés à travers la colonne. Les deux lentilles du condenseur, C1 et C2, sont mises au-dessus de l'échantillon avec leurs ouvertures, et les faisceaux d'électrons vont interagir avec l'échantillon.

Les échantillons doivent être suffisamment minces afin que chaque faisceau d'électrons puisse passer à travers et préserver le maximum d'intensité possible. Après l'interaction avec l'échantillon, les électrons sont focalisés par la lentille pour la formation une image. L'ouverture de l'objectif peut être utilisée pour sélectionner les électrons directs ou dispersés qui peuvent contribuer à l'image. Une série de lentilles est utilisée au-dessous de l'échantillon pour agrandir l'image. En outre, les lentilles disposées au sein du microscope électronique sont sous forme de bobines magnétiques qui influencent les trajectoires des faisceaux d'électrons.

Les principaux modes d'observation en MET sont : le mode diffraction et le mode image.

### 1.4.1 Mode diffraction

Avant de définir le Mode Diffraction (MD), il est nécessaire de citer les différences entre les électrons et les rayons X :

- les électrons sont des particules négativement chargées alors que les rayons X sont neutres
- les électrons diffusés (élastiques et inélastiques) ont une énergie beaucoup plus faible que les rayons X
- les électrons sont dispersés / diffractés plus fortement que les rayons X par des forces de Coulomb
- en raison de leur charge, les électrons peuvent être dirigés et accélérés à très grande vitesse en direction de l'échantillon en appliquant un potentiel.

La diffraction est un phénomène où la nature ondulatoire des électrons et des photons est la plus évidente. Le MD se produit lorsque des vagues d'électrons interagissent avec les atomes ; en général, cet effet est plus fort lorsque la longueur d'onde est inférieure ou égale à la taille des objets rencontrés. Les diagrammes de diffraction sont formés en raison des interférences constructives et destructives entre les différentes ondes diffractées [Fra06b].

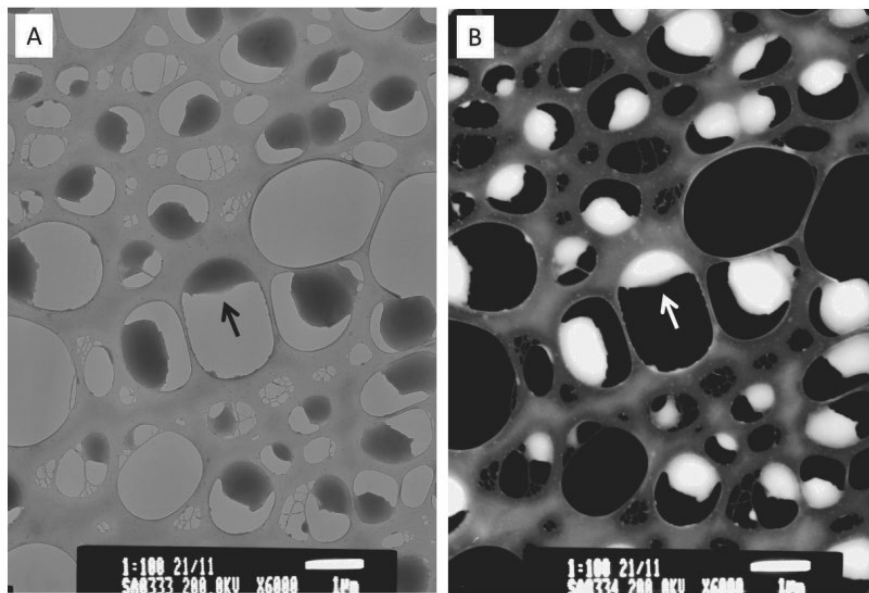
Le MD peut être utilisé pour étudier les matériaux cristallins et trouver leur structure. Dans les matériaux cristallins, les espacements entre plans atomiques sont caractérisés par leur structure. Pour former le diagramme de diffraction dans un MET, la force de la lentille intermédiaire est réglée de telle sorte qu'elle projette le plan focal de la lentille de l'objectif sur l'écran fluorescent. Ce diagramme de diffraction est enregistré sur un film négatif ou une caméra CCD. Le faisceau non diffracté qui, par définition, passe directement à travers l'échantillon, est dirigé vers le centre de l'image. Les données du MD sont formées dans le plan de diffraction de la lentille de l'objectif par les électrons qui sont dispersés. Une analyse détaillée est illustrée dans [WC09].

### 1.4.2 Mode image

Dans le MET, quand un faisceau d'électrons de haute énergie traverse un échantillon mince, la plupart des électrons participent à la formation de l'image. Ceux-ci sont appelés « des électrons transmis » et comprennent à la fois des électrons déviés et non déviés. Le faisceau d'électrons direct étant le faisceau qui traverse l'échan-

tillon sans aucune déviation de sa direction d'origine. De ce fait, il est concentré sur le plan focal de la lentille de l'objectif perpendiculairement à l'axe optique. En outre, les autres électrons, appelés faisceaux diffractés, sont dispersés en dehors de l'axe focal de la lentille [Gir10].

Les électrons diffractés relativement à un angle spécifique peuvent ainsi être sélectionnés par l'insertion d'une ouverture dans le plan focal de la lentille de l'objectif. Si les électrons transmis sont sélectionnés, l'image résultante est appelée le champ clair (CC), et si les électrons diffractés sont sélectionnés, l'image est appelée le champ sombre (CS) [Gir10]. La figure 1.3 illustre la formation de CC et CS d'une image d'ADN.



**FIGURE 1.3** — Micrographies du microscope de bobines d'ADN marquées par des particules d'or ; (A) en champ clair et (B) en champ sombre . Le contraste vu dans la partie A est inverse à la partie B. La différence de contraste entre CC et CS peut par exemple être observé sur le lieu marqué par une flèche [Gir10].

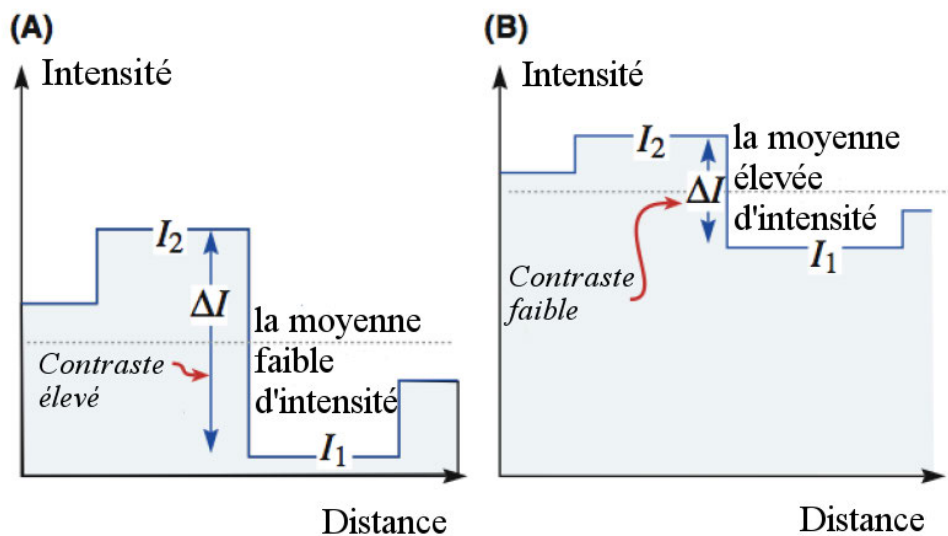
### 1.4.3 Mécanismes de formation du contraste

Le contraste est défini comme la différence d'intensité entre une région d'intérêt et son arrière plan [WC09] :

$$C = \frac{I - I_{\text{arriere\_plan}}}{I_{\text{arriere\_plan}}} \quad (1.1)$$

Dans le cas où une onde d'électrons traverse un échantillon, un changement se fait à la fois au niveau de l'amplitude, mais aussi au niveau de la phase de l'onde d'électrons. Dans la plupart des cas, les deux types de changement contribuent à la formation de l'image. Cependant, la création du contraste est fortement liée au choix entre le niveau de l'amplitude et la phase de l'onde.

L'intensité de l'image est déterminée par la densité d'électrons qui frappe l'échantillon. L'intensité et le contraste sont variables (voir figure 1.4 pour une illustration). Le contraste peut être faible ou important.



**FIGURE 1.4** — Différence entre le contraste et l'intensité. ( $I_1$  et  $I_2$ ) présentent les niveaux d'intensité et ( $\Delta I$ ) définit le contraste.

Lorsque le faisceau muni d'une intensité uniforme d'électrons, traverse l'échan-

tillon, une intensité non uniforme au niveau de l'image est mesurée. Ce changement de l'intensité de l'électron se traduit par la fonction du contraste de l'image.

## 1.5 Limitations du MET

### 1.5.1 Effets des radiations ioniques

Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, tous les composants du MET sont dans le vide, y compris le spécimen. De ce fait, la préparation du spécimen devient une tâche non dénuée d'importance sans oublier qu'une bonne fixation est nécessaire.

De nos jours, les deux techniques les plus utilisées sont : la fixation chimique et la fixation cryogénique (*cf.* 1.5). La fixation chimique peut altérer le spécimen (e.g. modifier sa structure ou son anatomie), ce qui représente un inconvénient par rapport à la reconstruction de l'information. La fixation cryogénique préserve la structure interne du spécimen en le congelant à la température de l'azote liquide [LFB05]. Cependant, cette méthode est considérée comme étant difficile d'un point de vue technique. En outre, elle pose des contraintes sur l'énergie du faisceau d'électrons. En effet, lorsque le faisceau chauffe le spécimen, son énergie sera trop élevée et le spécimen sera décongelé et évaporé.

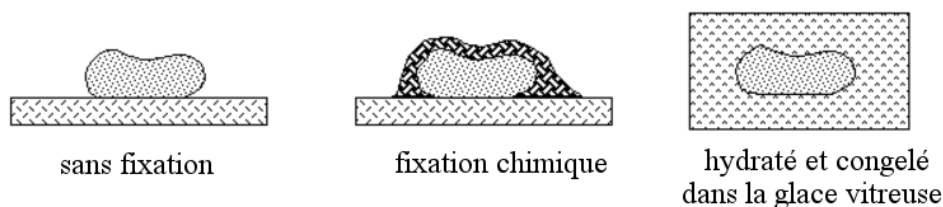
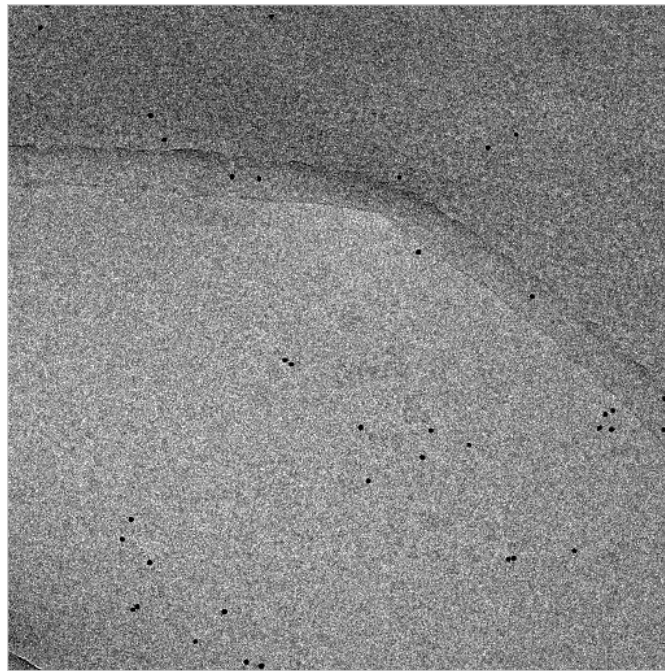


FIGURE 1.5 — Différentes méthodes de fixation.



La vaporisation n'est pas la seule raison qui fasse que l'énergie du faisceau ne soit pas trop élevée. En effet, les électrons représentent un type particulier de radiation ionique, qui par conséquent, peuvent endommager le spécimen (et dans certains cas également le capteur). Afin d'éviter cette situation, la dose totale d'électrons reçue par le spécimen doit être réduite au maximum. Cependant, la diminution de l'énergie du faisceau augmente le bruit dans les images acquises. Par exemple, dans l'imagerie biologique, quelques centaines d'électrons seulement passent par chaque  $1 \text{ nm}^2$  de spécimen [WC09]. De ce fait, la qualité de l'image acquise avec une si faible dose d'énergie se dégrade comme le montre la figure 1.6, le rapport signal sur bruit de cette image est 5,16 dB.



**FIGURE 1.6** — Images d'une tranche de cellule eucaryote obtenu par cryo-fixation.

### 1.5.2 Taille du spécimen

En MET, le spécimen, préparé sous forme de lame mince, doit être contenu à l'intérieur d'un disque ou d'une grille de 3 mm de diamètre : ceci constitue un standard pour tous les microscopes actuellement sur le marché [Col98]. Cependant, le problème le plus délicat est posé par l'épaisseur du spécimen. Dans un MET, un spécimen doit être suffisamment mince pour être transparent aux électrons. En d'autres termes, une quantité suffisante d'électrons passe à travers l'échantillon dans un délai raisonnable, afin d'obtenir toute information interprétable. Par conséquent, les spécimens d'épaisseur plus mince que 100 nm doivent être utilisés [WC09], ce qui rend leur préparation encore plus difficile. En outre, les spécimens minces ont moins de contraste.

### 1.5.3 Projections manquantes

Une autre limitation du MET est rattachée aux angles d'inclinaison. Lors de l'inclinaison du spécimen autour de l'axe, la trajectoire de l'électron transmis à travers l'échantillon s'allonge. L'électron pourrait être alors dispersé plusieurs fois et il pourrait également perdre toute son énergie. En d'autres termes, si l'angle d'inclinaison est élevé (*i.e.* supérieur à  $70^\circ$ ), le spécimen devient non transparent pour les électrons.

Un autre problème est de savoir comment garder le spécimen à sa place sur le porte-objet lorsque les angles d'inclinaison sont élevés. Pour cette raison, il n'est pas possible de basculer le spécimen à  $360^\circ$  degrés. En fait, généralement le spécimen pourrait être incliné seulement de  $-70^\circ$  à  $+70^\circ$ , ce qui déclenche le problème du prisme triangulaire manquant dans l'espace d'acquisition [ATM06]. Ce manque peut être interprété comme une zone « aveugle » dans l'espace de Fourier (*cf.* figure 1.7).

L'impact principal de cette zone manquante résulte en une perte d'information qui apparaît dans la phase de reconstruction, ce qui explique la perte de résolution

et des artefacts d'épandage en étoile due aux effets d'interpolation (*cf.* figure1.8).

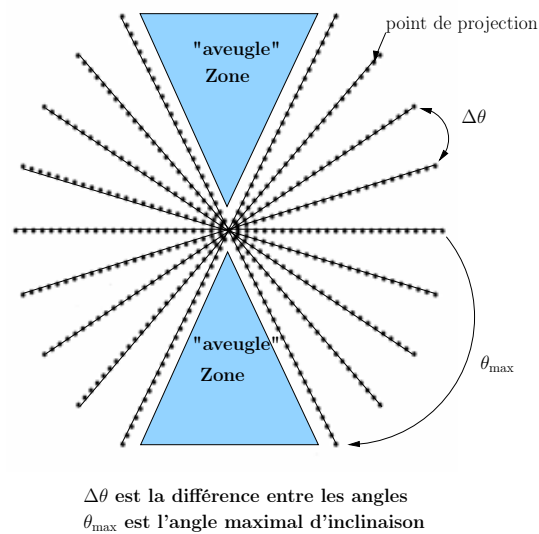


FIGURE 1.7 — Illustration de l'échantillonnage des données dans l'espace de Fourier.

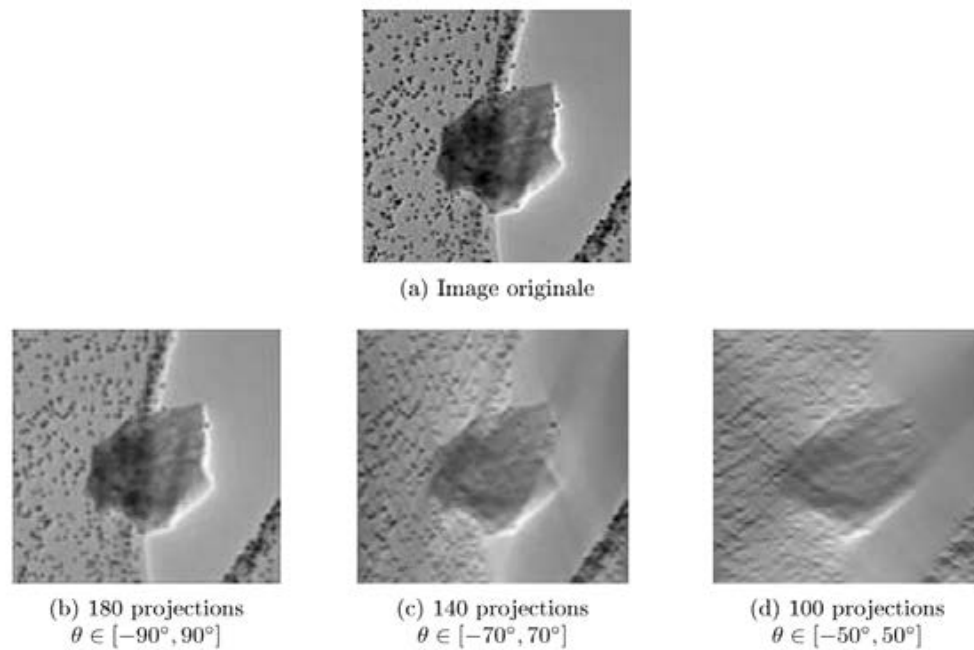
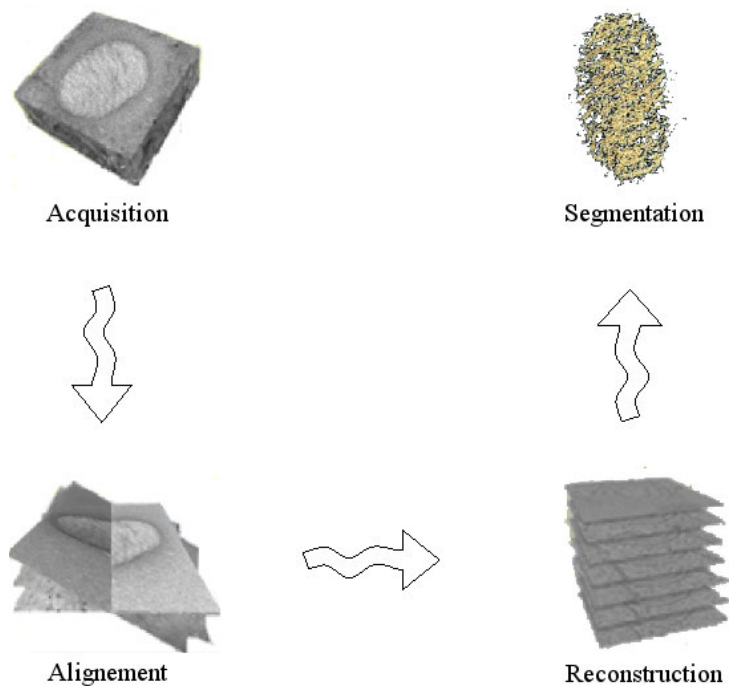


FIGURE 1.8 — Images reconstruites présentant des artefacts dus aux angles manquants [Tra13].

## 1.6 Tomographie électronique

Une image du MET représente une projection 2D d'une structure 3D. En appliquant la tomographie d'électrons, nous pouvons obtenir la structure 3D de l'objet en se basant sur une série d'images de projection 2D. La tomographie électronique se compose de quatre étapes principales, représentées par la figure 1.9. Dans la première étape, une série d'images d'inclinaison est établie à partir de la même région d'intérêt sur une plage d'inclinaison par incréments angulaires de 1 ou 2 degrés. La série d'images obtenue est alignée sur un axe d'inclinaison commun afin d'éliminer les décalages et les rotations relatives entre les images successives. Une reconstruction est calculée en appliquant un algorithme sur la série d'images alignées. Dans la dernière étape, une segmentation du tomogramme reconstruit est effectuée afin de faciliter une analyse ultérieure.



**FIGURE 1.9** — Étapes successives du processus de reconstruction 3D tomographique.

### 1.6.1 Approche théorique

Une approche théorique modélise la reconstruction d'un objet à travers ses projections. Cette approche a été décrite par Johann Radon (1887-1956), mathématicien autrichien connu pour ses travaux sur la théorie de l'intégration. Radon a permis, à travers sa transformée (TR), de reconstituer une fonction à l'aide de la totalité de ses projections selon des droites concourantes [Rad17]. En tomographie, l'ensemble des projections coniques lorsque la source décrit une trajectoire curviligne définit la Transformation Rayons X [LN83]. Il est important de remarquer qu'en 3D, la transformée de Radon ne coïncide pas avec la transformée Rayon X utilisée dans la tomographie électronique. En effet, cette dernière est égale aux intégrales de la fonction 3D sur des droites, alors que la transformée de Radon 3D consiste à intégrer sur des plans de l'espace [PMG96].

Dans [GHV04, HDH13], les auteurs soulignent que la transformée de Radon est une généralisation de la transformée de Hough<sup>1</sup> [Hou62], utilisée en analyse d'images.

La transformée de Radon ne se limite pas à la détection de lignes comme la transformée de Hough [CRT94, Dea93]. Des travaux récents introduisent des extensions sur la transformée de Radon permettant de détecter des courbes paramétriques [EFNH15]. Le champ d'application de la transformée de Radon couvre plusieurs domaines dans la recherche en vision par ordinateur, analyse de scène, compression d'image et bien d'autres pistes.

#### 1.6.1.1 Formalisme mathématique

[Rad17] définit formellement la TR comme suit :

Soit  $f(x, y)$  une fonction définie dans l'espace euclidien de deux dimensions  $\mathbb{R}^2$  et  $TRf(\rho, \theta)$  est sa transformée dans le domaine Radon :

$$TRf(\rho, \theta) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \delta(\rho - x \cos \theta - y \sin \theta) dx dy. \quad (1.2)$$

---

1. La démonstration se trouve dans [Dea81].

Où  $\theta \in [0, \pi]$ ,  $\rho \in ]-\infty, \infty[$  et  $\delta(\cdot)$  la fonction de Dirac.

L'espace  $(\rho, \theta)$  est généralement appelé l'espace Radon (ER) ou l'espace des paramètres. L'équation  $\rho = x \cos(\theta) + y \sin(\theta)$  représente l'équation paramétrique d'une ligne droite aux coordonnées polaires. L'équation 1.2 signifie l'intégration de l'image le long de chacune de ces lignes droites et l'affectation de la valeur résultante au le point d'ER correspondant. Ces intégrales issues de la fonction  $P_\theta(\rho) = TRf(\rho, \theta)$ , précisent la projection en parallèle de la fonction à l'angle  $\theta$ ; les lignes droites d'intégration qui sont perpendiculaires à l'angle  $\theta$  sont appelées rayons ou faisceaux de projection (voir figure 1.10).

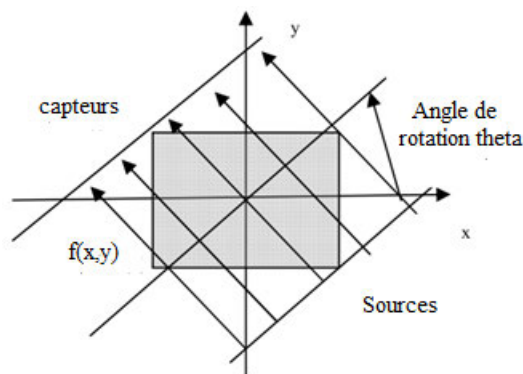


FIGURE 1.10 — Projection de Radon selon des rayons parallèles [WL06].

### 1.6.1.2 Réversibilité

La TR est inversible dans le domaine continu. L'inverse peut être calculé avec les formules suivantes [Ner96] :

$$\begin{aligned}
 S(\omega, \theta) &= \int_{-\infty}^{+\infty} TRf(\rho, \theta) |\omega| \exp^{-j2\pi\omega\rho} d\rho \\
 Q(\rho, \theta) &= \int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega, \theta) |\omega| \exp^{j2\pi\omega\rho} d\omega \\
 f(x, y) &= \int_0^\pi Q(x \cos \theta + y \sin \theta, \theta) d\theta
 \end{aligned} \tag{1.3}$$

Ce qui revient d'abord à filtrer l'ER dans la direction  $\rho$  au moyen d'une fonction de transfert  $H(f) = |f|$ , et puis rétroprojeter le ER filtré sur le domaine de  $f$ . Bien que ces formules tiennent dans l'espace continu, l'inversion de la TR discrète a été introduite avec des solutions rapprochées (en raison de la perte de précision par la discrétisation). Plusieurs approches ont été proposées, telles que la reconstruction algébrique et l'inversion de Fourier [Ben08].

## 1.6.2 Géométrie d'acquisition

L'acquisition avec un seul axe est le système d'acquisition le plus général. Elle est basée sur l'inclinaison de l'échantillon autour de l'axe eucentrique du porte-objet du microscope avec un minimum d'inclinaison angulaire constante, qui se déplacerait sur une grande et large plage d'inclinaison possible. A ce stade, il faut surtout prendre en considération l'épaisseur de l'échantillon. En effet, l'épaisseur augmente selon l'angle d'inclinaison. Afin de corriger cette variation au niveau de l'épaisseur, faite tout au long de la série d'inclinaisons, le pas d'incrément de Saxton peut être utilisé. Le schéma de Saxton utilise des pas d'incrément de taille plus petite lorsque les angles d'inclinaison sont plus élevés pour compenser la perte en échantillonnage de l'objet. Les angles d'inclinaison pour le schéma de Saxton sont donnés par :

$$\theta_{n+1} = \theta_n + \sin^{-1}(\sin\theta_0 \cos\theta_0) \quad (1.4)$$

Où  $\theta_0$  est l'angle initial d'incrément.

Lors de l'inclinaison du porte-objet avec un angle  $\theta$ , l'épaisseur effective, où les électrons traversent, augmente avec un facteur  $\frac{1}{\cos\theta}$ . Ce type de géométrie produit deux principaux types d'artefact d'imagerie, à savoir l'allongement des structures dans la direction de l'axe  $Z$  et une diminution de contraste dans la direction de l'axe  $X$  [GBKC13].

Le développement de la microscopie à deux axes pourrait compenser partiellement ce problème. En effet, cette technique requiert une rotation du spécimen autour d'un deuxième axe perpendiculaire au premier et réduit ainsi le problème du

prisme triangulaire manquant à un problème de pyramide manquante [DKBB10]. L'effet de cette technique est illustré dans la figure 1.11. La tomographie à deux axes est capable de corriger de manière efficace le second type d'artefact (la diminution de contraste) [GBKC13]. Cependant, l'application de ce type de cette technique est difficile, car l'effet de radiation augmente dans la deuxième série d'acquisitions. Pour cette raison, Guesdon *et al.* [GBKC13] suggèrent de propager la dose d'électrons sur les deux séries d'axes d'inclinaison par l'acquisition alternant entre les deux axes (en changeant l'axe après chaque image capturée).

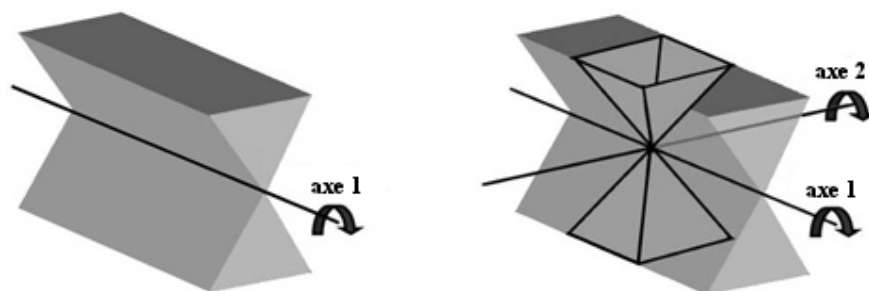


FIGURE 1.11 — Géométrie d'acquisition : seul axe vs double axe.

### 1.6.3 Alignement

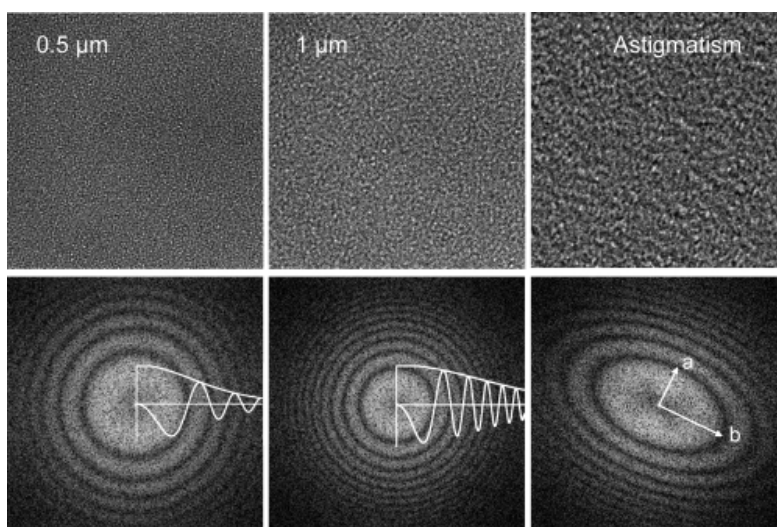
Nous commençons par mentionner le problème d'incertitude des angles d'acquisition du à l'impression d'inclinaison mécanique du microscope. L'incertitude angulaire est considérée comme un facteur négligeable dans la tomographie électronique [Col98], par conséquent la majorité des approches de l'alignement proposées pour corriger la transformation géométrique d'acquisition ne traitent pas l'incertitude. En fait, la résolution de la reconstruction a été médiocre lors de publication de [Col98], donc la correction de l'incertitude angulaire n'a aucun effet sur la résolution de l'objet reconstruit. De nos jours, et en raison de l'amélioration des techniques d'acquisition et de reconstruction, la résolution devient un facteur important, surtout quand nous cherchons à reconstruire et localiser de petites particules telles que ribosome et nucléosomes. Traiter l'incertitude angulaire permettra une meilleure résolution de reconstruction.



De plus, lors de l'acquisition des images de projection à différents angles d'inclinaison, tout mouvement de l'échantillon se traduit notamment par des changements locaux entre les différentes images acquises. Afin d'obtenir une reconstruction 3D de la série d'inclinaison, ces changements locaux doivent être compensés. En réalité, ces derniers ne peuvent être complètement soustraits, mais sont réduits. Aussi, pour compenser ces décalages, nous recherchons un axe de basculement commun pour toutes les images obtenues. Généralement, la procédure d'alignement est introduite soit par suivi de repère de décalage ou par corrélation croisée.

#### 1.6.4 Fonction de transfert de contraste

La fonction de transfert de contraste (FTC) est un autre facteur qui intervient dans l'acquisition des images par le microscope électronique. La FTC modélise la transmission du signal en fonction de la fréquence spatiale (*i.e.* résolution) dans l'espace de Fourier. La FTC provient principalement des aberrations des lentilles et de la défocalisation utilisée dans l'imagerie. La figure 1.12 illustre des exemples de la FTC. L'image de la partie gauche de la figure 1.12 présente une défocalisation obtenue à  $0,5\mu m$ , et l'image du milieu est une défocalisation de  $1\mu m$ . Les anneaux dans l'espace de Fourier de la deuxième image sont situés plus près de l'origine et oscillent plus rapidement. Un exemple d'une image astigmatique et son diagramme de diffraction sont présentés dans la partie droite. La plus grande défocalisation est selon l'axe  $a$ , et la plus petite est selon l'axe  $b$ . Les artefacts de la FTC consistent en des oscillations qui atténuent les détails de la structure. Aussi, elle peut inverser le contraste dans des zones de l'image. La correction des effets de la FTC est essentielle pour avoir une projection de l'échantillon à haute résolution. Dans les débuts de la tomographie électronique, il n'y avait pas eu besoin de corriger la FTC dans la mesure où la résolution acquise était limitée par la technologie microscopique. Cependant, comme la technique a été améliorée et la résolution réalisable a augmentée, la nécessité d'une correction FTC est devenue nécessaire de plus en plus importante [OS11].



**FIGURE 1.12** — Fonction de transfert de contraste des images de projections [OS11].

Le premier défi pour la correction de la FTC est le faible SNR qui affecte les oscillations de la FTC dans le domaine fréquentiel de Fourier. Une approche intéressante de correction est proposée dans [MG03]. Cette approche est basée sur l'hypothèse que la défocalisation sur l'axe d'inclinaison est constante durant l'acquisition. Les images de l'inclinaison de la série sont divisées en tuiles, et la moyenne des spectres de toutes les tuiles de la série ayant la même défocalisation est calculée. Cela donne un spectre moyen avec les oscillations de la FTC visibles et bien détaillées, et donc un ajustement précis avec le modèle théorique de la FTC peut être effectué. À partir de cette FTC moyenne, la FCT à un point quelconque d'une image dans la série d'inclinaison peut être facilement déterminée par la géométrie simple.

Un autre problème de la correction de la FTC en tomographie électronique est le gradient de la défocalisation le long de la direction perpendiculaire à l'axe de l'inclinaison dans la série de projection. Une approche proposée dans [FLC06] décompose ce problème de correction globale en plusieurs problèmes locaux spatialement invariants qui sont limités dans des bandes parallèles à l'axe d'inclinaison. De cette façon, la correction de la FTC peut être appliquée à la série d'inclinaison alignée avant la reconstruction tomographique.

Dans les travaux de cette thèse, il était prévu d'inclure la FTC sous forme paramétrée dans le coût et de l'optimiser avec les autres paramètres. Cependant, cette inclusion n'a pas été faite lors de la thèse faute de temps et constitue un axe d'intérêt de nos futurs travaux. Les travaux de la thèse ont été effectués sur des images fournies par l'IGBMC sur lesquelles la FTC avait été corrigée.

### 1.6.5 Reconstruction

Le but de la reconstruction tomographique consiste à obtenir la structure en 3D de l'échantillon dans la série d'inclinaisons alignées proposées.

La structure en 3D peut être reconstruite soit par les méthodes analytiques soit par les méthodes algébriques. Les méthodes analytiques sont fondées sur la transformée de Radon. La reconstruction peut être également effectuée par une technique algébrique itérative, qui traduit le problème de la reconstruction en un ensemble d'équations linéaires :

$$Ax = b \tag{1.5}$$

où  $A$  est la matrice de projection,  $x$  est l'objet d'origine et  $b$  est l'ensemble des données de projection. La solution au problème de reconstruction est alors établie sur la base d'un procédé itératif.

## 1.7 Analyse du tomogramme

Le tomogramme 3D est une image volumique en niveaux de gris qui est difficile à exploiter directement. Il est donc nécessaire de segmenter les objets d'intérêt pour étudier le tomogramme. Nous rappelons que la segmentation est un processus de traitement d'images permettant de décomposer une image en des régions cohérentes et de localiser les objets d'intérêt. Généralement, cette segmentation est manuelle. La segmentation peut se faire à l'aide des logiciels comme l'**IMOD** [KMM96], où l'utilisateur trace manuellement les bordures des particules d'intérêt dans chaque coupe du tomogramme. Ensuite, le logiciel fait la liaison

entre les bordures tracées dans chaque coupe, et donne une couleur différente pour chaque structure trouvée. Plusieurs logiciels sont utilisables pour visualiser des tomodogrammes segmentés. Nous pouvons citer à titre d'exemple **UCSF Chimera**<sup>2</sup>. Avec l'évolution des techniques d'acquisition et la complexité de cellules acquises, la sélection manuelle est devenue difficile et coûteuse. Donc, le besoin en méthodes automatiques de sélection (segmentation), ou semi-automatiques est devenu de plus en plus persistant.

L'objectif de la segmentation est de grouper les pixels ou voxels en sous-ensembles qui correspondent à des régions ou des objets significatifs pour rendre la visualisation plus sémantique et l'interprétation plus facile. Pour l'œil humain, la limite des objets et des régions significatives intuitive. Cependant, il est difficile pour l'ordinateur de trouver des critères quantitatifs qui définissent des zones significatives sur la base des propriétés de pixels tels que les contours, la luminosité, la couleur, la texture, etc. En microscopie électronique, la caractéristique d'intérêt correspond généralement à des pixels possédant des intensités différentes par rapport à l'arrière-plan, au moins localement, ou celles regroupées dans certains modèles. Donc, l'interprétation de ces données nécessite la discrimination des caractéristiques structurelles significatives de ces régions sur l'arrière-plan de l'image qui présente des artefacts et un rapport de signal-bruit très faible. L'objectif est de localiser ces régions dans l'image, puis effectuer la segmentation. La nécessité d'une segmentation devient plus importante pour les images 3D. En plus de l'augmentation de la complexité, la compréhension d'une image 3D est beaucoup plus difficile, en raison des capacités limitées de visualisation. La perception des certains objets est entravée de manière significative, lorsqu'ils sont occultés par d'autres objets ou bruités.

Pour ces raisons, la segmentation assistée par ordinateur est une tâche importante dans le cadre de la cryo tomographie électronique.

Il existe plusieurs algorithmes de segmentation dans la littérature. Leur performance, dans la plupart des cas, est relativement liée à l'application, et il n'y

---

2. <http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>

a pas d'algorithme unique qui fonctionne aussi bien avec les différents types de données [Fra06a]. Par conséquent, seuls les algorithmes qui prennent de l'importance dans la tomographie électronique ou ont été spécifiquement développés pour la tomographie électronique seront présentés et illustrés dans le chapitre quatre.

## 1.8 Problématique

La segmentation d'un tomogramme est difficile pour les images 3D en raison de leur complexité, de l'effet de flou dû au mouvement de l'objet lors de l'acquisition, le bruit généré par celle-ci, des artefacts causés par le champ de vision limité (zone aveugle de l'acquisition) et de la fonction de transfert du contraste qui est pratiquement inconnue (par exemple la fonction diffère dans chaque partie pour chaque projection), en particulier pour un échantillon épais. La combinaison de ces problèmes augmente la complexité de la tâche de segmentation.

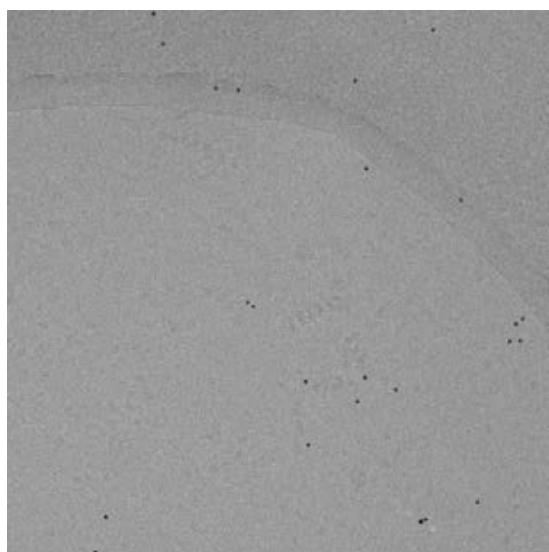
Avant d'exposer la problématique, nous commençons par introduire l'intérêt biologique et la technique d'acquisition de l'image utilisée dans nos recherches. Plus d'un quart de la masse cellulaire d'une cellule eucaryote comprend des ribosomes qui effectuent la synthèse des protéines, un processus au cours duquel de nombreux ribosomes peuvent se lier simultanément à un ARN messager (l'acide ribonucléique messager ou ARNm, qu'est une copie transitoire d'une portion de l'ADN correspondant à un ou plusieurs gènes) pour former un poly-ribosome complexe ou aussi appelé polysomes. Cette structure permet la description détaillée d'un complexe représentatif, qui comprend 23 ribosomes et a un poids moléculaire d'environ  $100MDa$ , une des plus grandes structures asymétriques d'un poly-complexe jamais déterminé, à haute résolution [MAM<sup>+</sup>14]. L'amélioration de la résolution permet une analyse plus profonde du niveau moléculaire et atomique des ensembles de poly-ribosome, qui n'a été pas possible précédemment [BCH<sup>+</sup>10]. Ainsi, ces analyses permettent une meilleure interprétation des données, et fournissent de nouvelles idées sur les mécanismes de ces structures. Les images de ces structures traitées dans notre travail de thèse, ont été capturées à l'aide d'un

détecteur d'électrons directs à haute sensibilité (Complementary Metal-Oxide Semiconductor, CMOS) qui a fourni des images avec un contraste significativement amélioré pour l'imagerie à haute résolution. Les images ont été acquises à une tension d'accélération de  $150kV$  avec faible dose d'électrons ( $30e^- \text{Å}^{-2}$ ). Ainsi, La caméra CMOS a été fixée pour acquérir des images de taille  $4096 \times 4096$  pixels à une résolution de  $3,4 \text{ Å/pixel}$ . Comme le but de ce travail était d'observer la structure fine (ribosomes), les images ont été coupées pour fournir un plus petit tomogramme pour contenir un ou deux polysomes.

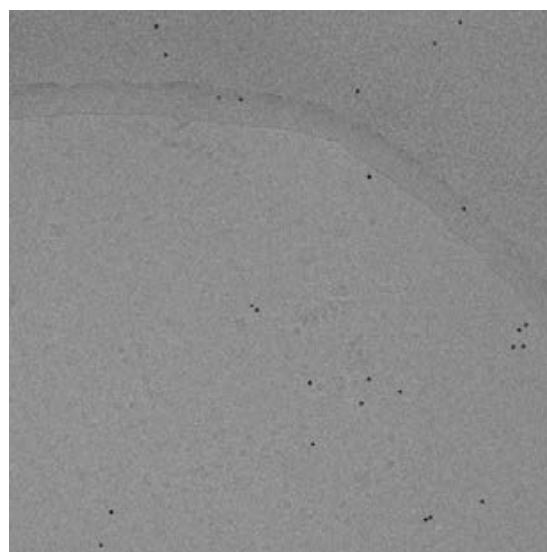
Notre travail vise à introduire une méthode de segmentation automatique afin de localiser les ribosomes à partir d'images tomographiques 3D de cellules eucaryotes. La première partie porte sur la qualité du tomogramme reconstruit à partir des projections des cellules eucaryotes. En effet, cette qualité étant insuffisante pour faire la segmentation, l'image 3D en niveaux de gris est faiblement contrastée et beaucoup de confusions existent entre les particules d'intérêt et l'arrière plan. La mauvaise qualité du tomogramme s'explique par les erreurs d'alignement de la série de projection.

En effet, l'alignement utilisé est le résultat d'une méthode qui opère par corrélation croisée. Cette méthode n'est même pas capable d'aligner les images successives à cause des changements géométriques entre chaque acquisition et le faible contraste des images. Une illustration du problème d'alignement est présentée dans la figure 5.4.

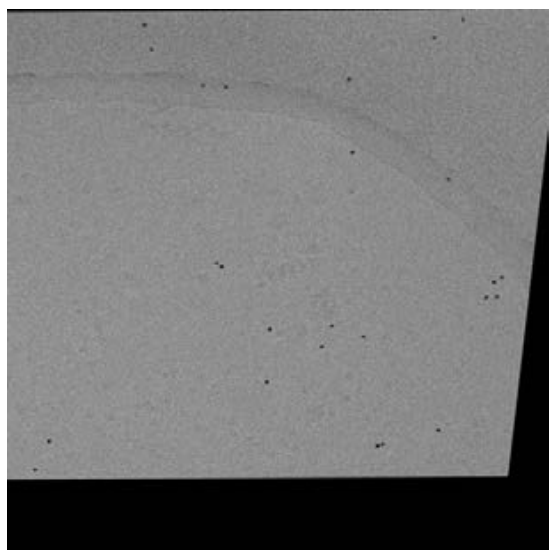
Dans cet exemple, les deux premières images (a) et (b) présentent deux coupes successives d'une série de projection. L'image (c) est l'image (b) alignée par rapport aux paramètres estimés. L'image (d) montre une superposition de l'image (a) et l'image (b) alignée. La corrélation croisée fonctionne mal dans ce cas, car les transformations géométriques modélisant les variations entre images ne sont pas linéaires, *i.e.* ne peuvent pas être estimées de manière exacte.



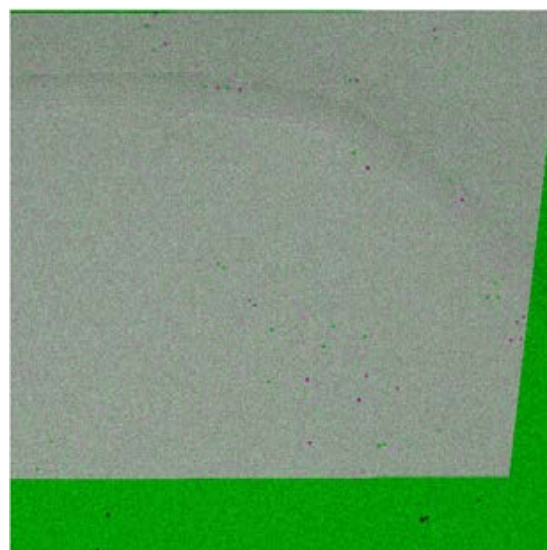
(a) image de projection 57 des cellules eucaryotes



(b) image de projection 58 des cellules eucaryotes



(c) image (b) alignée par rapport l'image (a)



(d) image (c) superposée sur (a)

**FIGURE 1.13** — Exemple de faible alignement par corrélation croisée.

Donc, dans la première partie de notre travail, il faut résoudre les problèmes d'alignement, y compris l'incertitude des angles d'acquisition.

Les problèmes d'alignement liés aux inclinaisons utilisées par le microscope

électronique en transmission affectent la qualité, mais aussi la résolution finale de l'objet reconstruit. Ces problèmes sont à la fois liés aux mécanismes d'inclinaison du porte-objet (connue aussi sous le nom de problème d'alignement des projections) mais aussi aux effets induits par les radiations.

- Pour la partie mécanique (*cf.* figure 1.14), il se peut qu'une erreur se produise lors du mouvement rotationnel de la plate-forme, et conduise à une erreur dans la position du porte-objet. Ainsi, il existe des mouvements indésirables de l'échantillon sur le porte-objet, en particulier avec les inclinaisons fortes [Col98].
- D'un autre côté, la dose d'électrons résulte d'un compromis entre l'endommagement de l'échantillon qu'elle induit et la qualité de l'image qu'elle donne au final [Fra06a].

Dans notre travail, nous nous intéressons à l'erreur mécanique. En effet, nous pouvons penser au système d'acquisition du microscope comme 2 axes alignés avec le plan du détecteur ( $OX, OY$ ) et le troisième dans la direction de la normale (*cf.* figure 1.15). Les déplacements suivant ( $OX, OY$ ) correspondent à la translation de la projection. Les déplacements suivant  $OZ$  perturbent la mise au point de la projection. Aussi, la rotation de l'angle  $\alpha$  correspond à une rotation de la projection du plan du détecteur. Ces paramètres sont les facteurs de transformation qu'il faut corriger pour avoir une meilleure reconstruction. Généralement, l'erreur touchant l'angle  $\theta$  est négligeable par rapport aux erreurs de mouvement de l'échantillon, et elle n'est pas incluse dans les corrections.

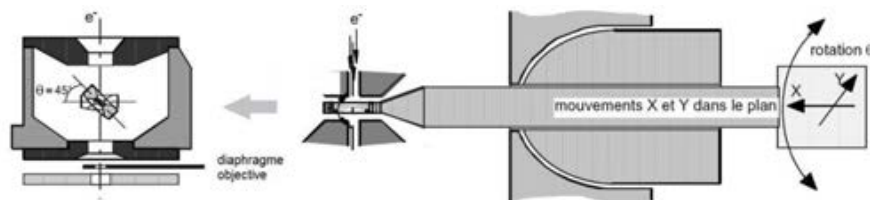


FIGURE 1.14 — Représentation du porte-objet d'un MET [Col98].



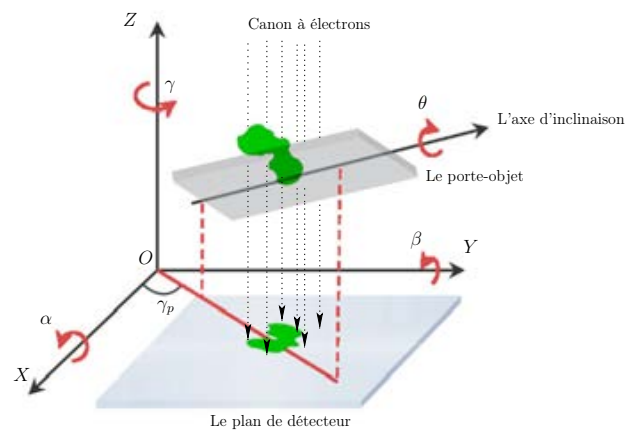


FIGURE 1.15 — Le mécanisme d'un microscope MET

En outre, les corrections de l'alignement des autres paramètres sont effectuées dans l'espace 2D, en utilisant des projections 2D. Corriger le déplacement d'un objet 3D par ses projections 2D conduira toujours à des erreurs de calcul en raison de la diminution de l'espace géométrique (à savoir 3D à 2D). Pour cette raison, nous proposons une approche qui portera sur les corrections géométriques dans leur espace d'origine, l'espace 3D.

Dans la phase d'automatisation de la segmentation nous utilisons des zones d'apprentissage pour guider la segmentation. Plusieurs critères de séparation sont utilisés comme le niveau de gris, la différence de contraste entre les régions de l'image, la texture, etc. Dans cette thèse, nous allons utiliser l'analyse multifractale pour déterminer et isoler les ribosomes dans le tomogramme reconstruit par notre approche de reconstruction.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exposé le principe de la microscopie électronique en transmission puis celui de la tomographie électronique. Cette dernière est très intéressante pour comprendre et caractériser les échantillons biologiques. Cela est

---

possible via l'analyse des informations 3D de l'objet obtenues à partir des projections acquises par le MET.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons les travaux relatifs aux étapes de la phase de reconstruction de la cryo-tomographie électronique.

Chapitre

# 2

---

## Reconstruction

### tomographique : état de l'art

#### Introduction

L'étape de reconstruction tomographique d'un objet 3D est principalement constituée de deux phases, à savoir, la phase d'alignement, de reconstruction. La phase d'alignement consiste à aligner toutes les projections sur un même axe tridimensionnel. Quant à la phase de reconstruction, elle porte sur l'estimation de la densité de l'objet 3D à partir de ses images de projection. Les régions d'intérêt seront ensuite identifiées dans le volume reconstruit, c'est la phase de segmentation qui sera traitée dans le chapitre 5.

Nous allons présenter au cours de ce chapitre l'état de l'art relatif à l'étape de reconstruction tomographique. Nous détaillons dans la première section les travaux proposés pour l'alignement des images, ensuite, nous introduisons la phase de reconstruction.

## 2.1 Alignement des images de projection

L'alignement des images tomographiques est une phase critique pour obtenir des informations 3D structurales à haute résolution. Cependant, le bruit, le cône manquant et l'hétérogénéité compliquent cette étape d'alignement. De plus, le manque d'informations relatif à la vérité terrain pose problème lors de la validation. La plupart des méthodes d'alignement en cryo tomographie électronique utilisent une sorte de corrélation croisée comme mesure [OFK<sup>+</sup>06, BSL<sup>+</sup>08] pour trouver des correspondances optimales dans une recherche exhaustive parmi toutes les transformations rigides possibles (translations et rotations). Le principal problème reste le fait que le bruit élevé et les données manquantes fournissent de nombreux faux positifs lorsque l'on compare deux structures.

### 2.1.1 Méthode d'alignement par marqueurs

Ces méthodes utilisent un certain nombre de marqueurs fiduciaires de haut contraste placés dans le volume 3D avant l'acquisition par le microscope. Avec leur haut contraste, ces marqueurs fiduciaires sont supposés être immobiles dans le volume pendant l'acquisition de la série d'inclinaison. De cette manière, les coordonnées de ces marqueurs dans les images de projection sont utilisées comme des références. Les changements de position de ces marqueurs traduisent également les changements d'orientation pendant la projection.

L'alignement se fait alors, en mesurant les coordonnées des marqueurs dans toute la série d'inclinaison. Les marqueurs les plus couramment utilisés sont « les particules d'or » qui ont un fort contraste [LVH07]. Les marqueurs sont supposés être immobiles par rapport à l'échantillon, et donc un changement de position des marqueurs implique le mouvement de l'échantillon. Les paramètres géométriques requis pour aligner les images sont dérivés de la mesure des positions projetées des marqueurs à l'aide de la méthode des moindres carrés.

Soit le  $i^{\text{e}}$  marqueur de calibrage  $m_i = (x_i, y_i, z_i)$ , où  $x_i, y_i, z_i$  représentent

les coordonnées dans le volume. Compte tenu du  $j^{\text{e}}$  paramètre de l'orientation  $(\phi_j, \theta_j, \psi_j)$ , nous pouvons définir les coordonnées mesurées de ce marqueur de calibrage dans l'image de projection comme suit :

$$\mathbf{p}_{ij} = (u_{ij}, v_{ij}) = \mathcal{A}_j m_i, \quad (2.1)$$

où  $\mathcal{A}_j$  est une transformation affine à angle d'orientation  $(\phi_j, \theta_j, \psi_j)$ , qui projette le marqueur de calibrage du système de coordonnées 3D (volume d'origine) dans le plan de l'image 2D (le plan de projection). Toutefois, s'il existe des erreurs d'orientation lors de l'acquisition de la projection, le paramètre d'orientation devient bruité  $(\phi_j^*, \theta_j^*, \psi_j^*)$  et provoque le changement des coordonnées réelles projetées des marqueurs de calibrage. Les coordonnées obtenues deviennent alors :

$$\mathbf{p}_{ij}^* = (u_{ij}^*, v_{ij}^*) = \mathcal{A}_j^* m_i, \quad (2.2)$$

De cette façon, l'alignement de la série d'inclinaison consiste à trouver une solution permettant de minimiser la fonction de coût, qui représente l'erreur quadratique entre les valeurs mesurées et les coordonnées prévues des marqueurs :

$$(i, j) = \operatorname{argmin} \sum_i \sum_j ((u_{ij} - u_{ij}^*)^2 + (v_{ij} - v_{ij}^*)^2) \quad (2.3)$$

Afin de trouver une solution unique pour l'équation (2.3), nous devons limiter l'équation (2.1) et l'équation (2.2) par la définition de toutes les variables comme étant des constantes sauf pour les angles de rotation à chaque projection [Kui99]. Outre l'exigence de temps de calcul pour la recherche d'une solution unique aux équations ci-dessus, les méthodes basées sur les marqueurs ne disposent pas d'un moyen global approprié pour définir les marqueurs distribués pour différents types de spécimens. Le réglage approprié des marqueurs distribués et le suivi de leur position avec précision représentent des étapes exigeantes en main-d'œuvre. Aussi, ces marqueurs à contraste élevé peuvent provoquer des artefacts dans l'objet reconstruit.

Plusieurs méthodes de suivi automatique des marqueurs sont introduites dans la littérature. Nous pouvons citer à titre d'exemple celle de [BZ06], de [SME<sup>+</sup>09]

ou de [HITO13] qui utilise la correspondance par modèle pour localiser les marqueurs. Dans [AMC<sup>+</sup>08], les auteurs ont proposé de suivre les marqueurs fiduciaires au moyen de champ aléatoire de Markov. Ils commencent par la localisation des marqueurs dans chaque image, suivie par une création d'un graphe reliant les marqueurs dans chaque image. L'alignement entre les images est pris par l'alignement des graphes correspondant des marqueurs entre chaque paire d'images en utilisant la formule de la probabilité de champs de Markov.

## 2.1.2 Méthode d'alignement par corrélation croisée

Les méthodes basées sur la corrélation croisée calculent les translations pour une série d'inclinaison d'une manière successive. Pour la tomographie électronique, les images de projection d'une série d'inclinaisons représentent différents aspects de la structure 3D. Dans une situation idéale, les images de projection successives ne devraient pas trop différer.

### 2.1.2.1 Alignement en utilisant la totalité de l'image

Cette méthode définit une fonction de corrélation croisée 2D discrète  $f(m, n)$  entre deux images de projections voisines  $I_1$  et  $I_2$  [FM92] :

$$f(m, n) = \frac{1}{MN} \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} I_1(i, j) I_2(i + m, j + n) \quad (2.4)$$

Où  $M$  et  $N$  désignent le nombre de pixels dans les directions verticale et horizontale pour ces images de projection.

La procédure d'alignement consiste à trouver un déplacement  $(m_0, n_0)$ , de sorte que la fonction  $f(m_0, n_0)$  atteigne sa valeur maximale parmi tous les décalages disponibles. Étant donné que les deux images de projection sont acquises à des angles d'inclinaison différents, la corrélation calculée ne devrait pas coïncider. Toutefois, trouver la valeur de corrélation maximale est équivalent à estimer les paramètres de décalage relatif. Une fois les estimations de déplacement relatif à un nombre suffisant de séries d'inclinaison obtenues, il est possible d'aligner les images en les

translatant avec l'inverse des valeurs de décalage trouvées. Il est possible d'accélérer le calcul de la corrélation en le faisant dans le domaine fréquentiel à l'aide de la transformée de Fourier et son inverse [FM92] :

$$f(m, n) = TF2^{-1}[TF2(I_1(i, j)).TF2(I_2(i + m, j + n))] \quad (2.5)$$

La figure 2.1 résume la démarche décrite ci-dessus. Cependant, la recherche exhaustive de la corrélation maximale reste coûteuse. Dengler propose dans [Den89] une approche de multi-résolution pour affiner les paramètres d'alignement en couplant chaque image de projection avec l'image reprojétée de l'objet reconstruit. Il est à noter que plusieurs extensions de cette approche ont été proposées dans la littérature. En outre, à chaque itération, seules deux images de projection successives sont en considération dans le calcul du paramètre de décalage. Comme cette procédure se fait de manière séquentielle pour toutes les images de projection, l'erreur s'accumule pour chaque paire d'images de projection ; ce phénomène est appelé la propagation de l'erreur [SBH84]. De plus, la corrélation croisée se concentre sur l'alignement du plan 2D et non sur un mouvement en 3D qui peut survenir dans la pratique.

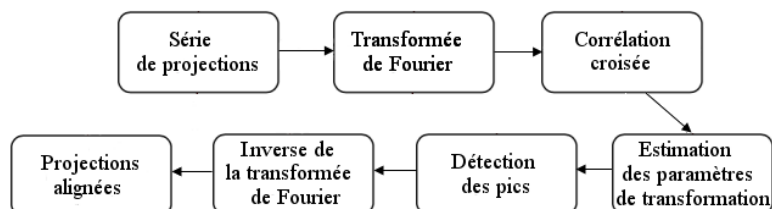


FIGURE 2.1 — Le processus de l'alignement par corrélation croisée.

Une méthode de correction par prédiction a été proposée par [ZSA10]. Cette méthode modélise mathématiquement les changements pour les premières images de projection. Ceci permet d'anticiper les changements pour le reste de la série. Cependant, le faible contraste d'images du microscope affecte la fiabilité de cette approche.

De plus, cette approche souffre de nombreux problèmes tels que [ACDL<sup>+</sup>10] :

- L'utilisation de la totalité de l'image à faible contraste ne fournit pas une bonne précision pour obtenir une reconstruction ayant une résolution optimale.
- L'erreur se propage le long de la série d'inclinaison.
- Pour les échantillons épais, les transformations estimées à partir des projections 2D ne suffisent pas pour corriger toutes les distorsions possibles introduites dans la phase d'acquisition.

### 2.1.2.2 Alignement en utilisant les descripteurs locaux et les points d'intérêt

Une façon de surmonter certaines des limitations exposées ci-dessus est d'aligner des images en se basant sur des points communs : au lieu de comparer chaque pixel, l'idée est de trouver des caractéristiques d'intérêt dans les images pour les utiliser comme des marqueurs fiduciaires. Ensuite, ces caractéristiques sont utilisées avec des techniques d'optimisation pour trouver les paramètres de la fonction de transformation géométrique. De nombreuses approches sont proposées dans ce domaine. Pour les points d'intérêts, les contours et les coins [HS88, MFM04] sont parmi les plus populaires pour des images naturelles. Les descripteurs basés sur des histogrammes locaux des intensités autour de chaque point d'intérêts se sont révélés être efficaces et discriminants [MS05, TM08]. Ces descripteurs sont également robustes pour le changement d'échelle, l'orientation et le contraste entre les images. Lorsque les fonctions sont sélectionnées, plusieurs algorithmes sont proposés pour estimer les paramètres de la fonction de transformation, nous citons l'algorithme *RANdom SAmple Consensus* (RANSAC) [FB81]. Cet algorithme fonctionne en sélectionnant un ensemble des points caractéristiques de ceux trouvés, puis il calcule l'erreur résiduelle de la fonction de transformation par rapport à cet ensemble de points. Le processus est répété plusieurs fois avec un remplacement aléatoire sur l'ensemble des points sélectionnés, où l'un avec la plus faible erreur résiduelle est choisi.



### 2.1.3 Alignement intégré au processus de reconstruction

Les méthodes traditionnelles d'alignement, mentionnées dans les sections précédentes, tentent d'estimer les paramètres de mouvement avant la procédure de reconstruction. Dans cette section, nous présenterons une méthodologie de recherche, qui considère le processus complet de la reconstruction comme étant un problème d'optimisation conjointe.

Dans une autre modalité, la cryo microscopie électronique à particules isolées, Yang *et al.* [YNP05] proposent une méthode pour optimiser, simultanément, la reconstruction de l'objet et le raffinement des orientations de projections. Cette méthode cherche à minimiser une fonction de coût par rapport au volume reconstruit et par rapport à l'ensemble des orientations. La projection du volume 3D produit une image 2D suivant l'angle d'inclinaison prédéfinie, Yang *et al.* ont déduit une relation entre l'angle d'orientation et le désalignement. Cette équation est simplifiée comme suit :

$$I_m = P(\phi_m, \theta_m, \psi_m)V + e, \quad (2.6)$$

Où  $P(\phi_m, \theta_m, \psi_m)$  est l'outil de projection utilisé pour avoir l'image de projection  $I_m$  à partir du volume 3D  $V$  suivant le triplet des angles de projection  $(\phi_m, \theta_m, \psi_m)$  et  $e$  est le bruit d'acquisition. Dans un tel cas, le problème de l'alignement consiste à minimiser l'effet d'erreur sur le triplet  $(\phi_m, \theta_m, \psi_m)$ . En employant la méthode des moindres carrés, le problème d'alignement devient un problème d'optimisation pour  $M$  images de projection  $I_m, m = 1, 2, \dots, M$  :

$$\operatorname{argmin} \rho(V, \phi_m, \theta_m, \psi_m) = \frac{1}{2} \sum_{m=1}^M \|P(\phi_m, \theta_m, \psi_m)V - I_m\|^2. \quad (2.7)$$

Ce coût quadratique est classique en traitement de l'image et plusieurs algorithmes de minimisation ont été proposés pour le minimiser. Dans leurs travaux, Yang *et al.* [YNP05] utilisent la forme analytique des projections et l'algorithme de quasi-Newton pour l'optimisation. Dans ce cas, les équations explicites pour le gradient sont difficiles à dériver en raison de la complexité de l'outil de projection

$P$ . Cependant, ils ont utilisé la différence finie pour approcher le gradient de la fonction de coût.

$$f'(x) \simeq \frac{f(x + \Delta x) - f(x)}{\Delta x} \quad (2.8)$$

De même, la dérivée partielle de  $\rho(V, \phi_m, \theta_m, \psi_m)$  par rapport à  $\phi_m$  est :

$$\frac{\partial \rho}{\partial \phi_m} = \frac{P(\phi_m + \Delta \phi, \theta_m, \psi_m) - P(\phi_m, \theta_m, \psi_m)}{\Delta \phi} (P(\phi_m, \theta_m, \psi_m)V - I_m). \quad (2.9)$$

En changeant la variable de dérivation dans l'équation (2.9), il est possible d'obtenir toutes les dérivées partielles de la fonction de coût. De même pour les variables restantes  $V, \phi, \psi$ . Une fois les gradients calculés, la direction de recherche  $\alpha$  est obtenue pour l'algorithme basé sur le gradient. La recherche du minimum local de l'équation (2.7) devient possible avec l'aide du négatif du gradient et certains choix de longueur de pas  $\eta$ . Cette procédure répond à l'inégalité :

$$\rho(x^{(0)} + \eta.\alpha) < \rho(x^{(0)}), \quad (2.10)$$

où  $x = (V, \phi_1, \dots, \phi_M, \theta_1, \dots, \theta_M, \psi_1, \dots, \psi_M)$  est composé de toutes les variables contenues dans la fonction de coût (2.7). Pour éviter de tomber dans un minimum local, la méthode utilise des angles d'inclinaison prédéfinis et traite le volume reconstruit désaligné comme une bonne estimation initiale de  $x^{(0)}$ . L'ensemble du processus de raffinement est illustré à la figure 2.2.

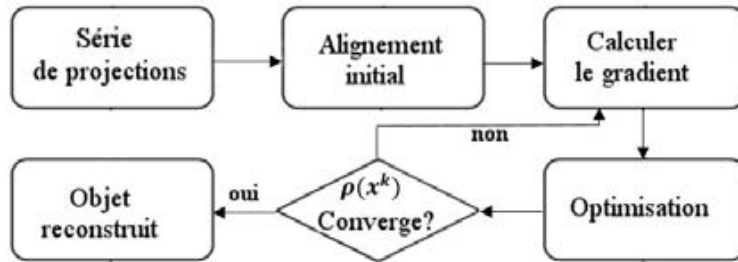


FIGURE 2.2 — Le processus de la méthode de raffinement par [YNP05].

S'inspirant de la méthode précédente, Tran *et al.* [TMT<sup>+</sup>13] proposent une méthode de correction du processus de reconstruction de manière hiérarchique

alternée appliquée à la cryo tomographie. Ils initialisent les paramètres de positionnement. Ensuite, ils font une première reconstruction suivie par un raffinement des facteurs de transformation. Si la méthode n'a pas encore convergé, ils relancent une nouvelle reconstruction. En effet, la reconstruction est basée sur une optimisation entre les projections réelles et les projections obtenues de l'objet reconstruit. De même, la phase de raffinement de transformation représente une optimisation entre les facteurs de transformation trouvés à partir des projections actuelles et celles de l'itération précédente.

L'estimation des paramètres de transformation géométriques (translation, rotation, et mise à l'échelle) retrouvés par les méthodes présentées ci-dessus est réalisée de manière successive. Donc, une fausse estimation de l'un des paramètres peut engendrer une propagation de l'erreur, ce qui influence les autres paramètres. Pour ces raisons, Tran *et al.* ont proposé d'utiliser un traitement simultané afin d'estimer les transformations dans les images de projection 2D en alternance avec la reconstruction.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons introduit en cryo tomographie une approche qui traite simultanément et au même niveau l'optimisation de l'objet reconstruit et des facteurs de transformation. De plus, nous prenons en compte l'erreur sur l'orientation du porte-objet. En effet, nous traitons les facteurs de transformation sur l'objet reconstruit lui-même, au lieu de les faire sur les projections. L'idée réside dans le fait d'essayer, pour chaque orientation utilisée, de reproduire la projection donnée par le MET. Le chapitre 3 apporte plus de détails sur cet apport.

## 2.2 Reconstruction 3D

Nous pouvons classer les algorithmes de la reconstruction en tomographie électronique en deux groupes : les méthodes de transformation analytiques et les méthodes algébriques. Les méthodes de transformation sont conceptuellement basées sur le théorème de la coupe centrale de Fourier qui lie les coefficients de Fourier

des projections aux coefficients de Fourier de l'objet lui-même. Ces techniques sont performantes dans le cas où l'ensemble complet de projections uniformément réparties sur  $180^\circ$  ou  $360^\circ$  est disponible. En outre, les méthodes analytiques sont très sensibles au bruit. Ainsi, elles ne sont pas bien adaptées pour les projections incomplètes bruitées obtenues par le MET. Malgré cela, la méthode de rétroprojection filtrée (RPF) [Rad92], qui appartient à cette catégorie, présente la technique de reconstruction standard actuelle dans la cryo-tomographie électronique. La raison est simple – l'algorithme n'est pas exigeant en temps de calcul.

La deuxième catégorie représente les techniques de reconstruction algébriques, à savoir, la méthode *ART* [GBH70], la méthode itérative *SIRT* [Gil72] et la technique de reconstruction algébrique simultanée (SART) [AK84]. Contrairement aux méthodes analytiques, les méthodes algébriques ne nécessitent pas un ensemble complet de projections réparties uniformément pour la reconstruction précise et elles sont plus stables dans des conditions bruitées [MHC98, FLR<sup>+</sup>02]. En outre, elles permettent d'utiliser les informations a priori dans le processus de reconstruction [SOBB96]. Cependant, les techniques algébriques sont très gourmandes en temps de calcul.

## 2.2.1 Reconstruction analytique

Le principe de reconstruction analytique repose sur l'inverse de la transformée de Radon que nous avons défini dans le chapitre précédent.

### 2.2.1.1 Transformée de Fourier

La transformée de Fourier [Fou22] permet la décomposition d'un signal  $x(t)$  à partir d'une famille de sinusoides, ce qui permet de représenter le spectre du signal dans le domaine fréquentiel [Pap77].

La transformée de Fourier, pour une fréquence  $\tau$ , consiste à intégrer le signal

temporel  $x(t) \in L^1(\mathbb{R})$  multiplié par le terme exponentiel  $\exp^{-2i\pi\tau t}$  :

$$TF(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \exp^{-2i\pi\tau t} dt \quad (2.11)$$

Le signal  $x(t)$  peut être rétabli à travers l'intégration de toutes ses composantes fréquentielles comme suit :

$$x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} TF(f) \exp^{2i\pi ft} df \quad (2.12)$$

La transformée de Fourier à deux dimensions est une généralisation de celle à une dimension.

Soit  $f(x, y)$  une fonction à deux variables. La transformée de Fourier continue de cette fonction est donnée par :

$$TF2(u, v) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \exp^{-2i\pi(xu+yv)} dx dy \quad (2.13)$$

Les deux variables  $u$  et  $v$  représentent respectivement les fréquences spatiales de la fonction selon les directions  $OX$  et  $OY$ .

L'inversion de la transformée de Fourier à deux dimensions est donnée par :

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} TF2(u, v) \exp^{2i\pi(xu+yv)} du dv \quad (2.14)$$

### 2.2.1.2 Théorème de la coupe centrale

Le théorème de la coupe centrale définit une relation qui existe entre les projections de  $f$  et les fréquences spatiales de  $f$ .

Soit une fonction  $f(x, y)$  une fonction de deux variables dans  $\mathbb{R}$ . La transformée de Fourier 1D d'une projection de Radon de la fonction  $f$ , est égale à la transformée de Fourier 2D de  $f$  le long d'une droite d'angle  $\theta$  et passant par le centre du domaine de Fourier (*cf.* figure 2.3).

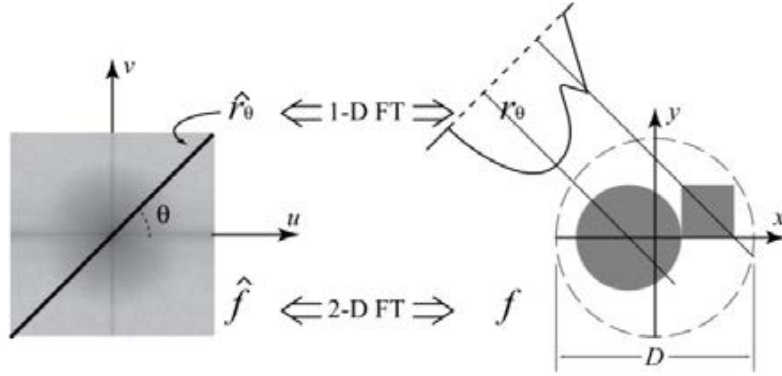


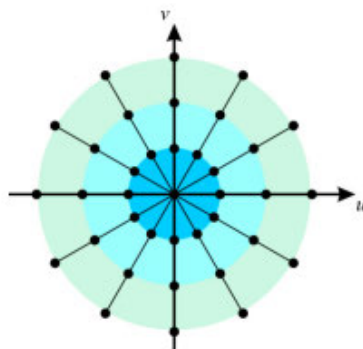
FIGURE 2.3 — Représentation graphique du théorème de la coupe centrale [Kin05].

Le théorème de la coupe centrale de la fonction  $f$  est exprimé comme suit :

$$\begin{aligned}
 TF(TRf(\omega, \theta)) &= \int_{-\infty}^{+\infty} TRf(\rho, \theta) \exp^{2i\pi\omega\rho} d\rho & (2.15) \\
 &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \delta(\rho - x \cos \theta - y \sin \theta) \exp^{2i\pi\omega\rho} dx dy d\rho \\
 &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \exp^{2i\pi(x\omega \cos \theta + y\omega \sin \theta)} dx dy \\
 &= TF2(\omega \cos \theta, \omega \sin \theta).
 \end{aligned}$$

Ce théorème permet de reconstruire l'objet en utilisant l'inverse de la transformée de Fourier 2D, à condition que l'espace de Fourier soit échantillonné sur toute la plage de fréquences. Étant donné que les images sont acquises à des angles discrets uniformément répartis, il existe des écarts réguliers dans l'espace de Fourier. Ces écarts n'aboutiront jamais à une reconstruction parfaite de l'objet. De ce fait, l'erreur va augmenter dans le calcul des composantes de fréquence supérieure en raison de sous-échantillonnage de l'espace de Fourier à ces fréquences plus élevées. La partie centrale de l'espace de Fourier est plus étroitement échantillonnée (illustrée par la figure 2.4), la densité d'échantillonnage est proportionnelle à la distance de l'origine. La partie centrale échantillonnée se traduira par un objet construit

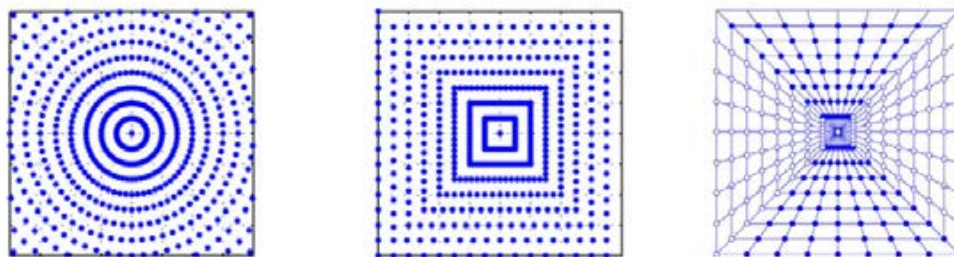
flou.



**FIGURE 2.4** — Échantillonnage du domaine des fréquences, avec une région plus étroite autour de l'origine échantillonnée [Mez12].

Dans le cas de la tomographie électronique, l'utilisation de ce théorème est limitée par le manque des projections qui rendent le remplissage de l'espace de Fourier incomplet. Il est possible de compenser ce manque d'information par interpolation dans cet espace. Des transformées de Fourier modifiées, comme *Non-Equispaced Fast Fourier Transform* (NFFT) et *Pseudo-Polaire Fast Fourier Transform* (PPFFT) [ACD<sup>+</sup>03], ont été proposées pour répondre au problème d'interpolation.

Ces deux méthodes appartiennent au problème de transformation d'un espace cartésien équidistant vers un espace fréquentiel non cartésien non équidistant, ce problème connu sous le nom de *Non-Uniform Fast Fourier Transform* (NUFFT) [PST01]. L'objectif de ce type de transformée est de transposer les données à partir des projections vers une des grilles données dans la figure 2.5 en minimisant les interpolations. Ensuite, à l'aide d'une transformée de Fourier inverse destinée à ce genre de grille, nous pouvons reconstruire l'image. Cependant, la qualité de l'image trouvée est inférieure à celle trouvée par la rétroprojection filtrée. Par suite, la nécessité d'utiliser une méthode itérative avec ce type de transformée pour contourner les données manquantes se fait en appliquant un suréchantillonnage sur les données de projection, ce qui entraîne inévitablement un temps de calcul plus long [MS12].



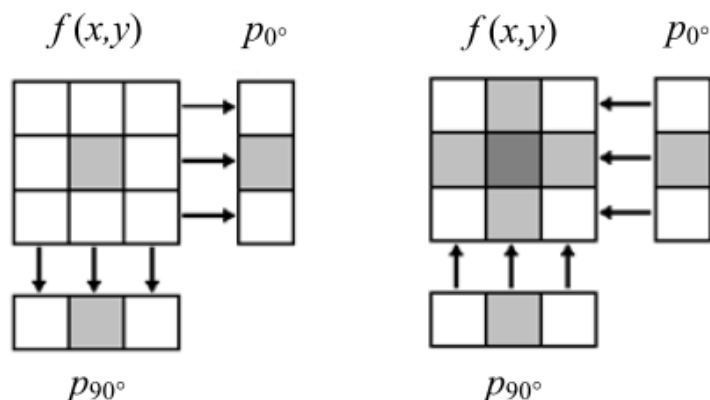
**FIGURE 2.5** — Différentes grilles de la transformée de Fourier modifiée : de gauche à droite polaire, linogram, psuedo polaire.

### 2.2.1.3 Rétroprojection filtrée

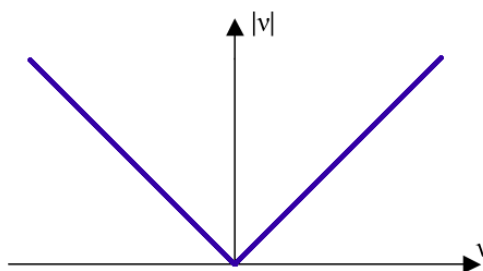
Une des méthodes les plus utilisées pour la reconstruction tomographique est la rétroprojection filtrée, qui est essentiellement équivalente à l'approche de reconstruction par Fourier, mais elle est appliquée dans l'espace réel de l'image [Fra06a]. Les images de projection sont la représentation de la valeur de la masse volumique de l'objet suivant des rayons de projection. Dans ce cas, la rétroprojection directe est la méthode de distribution de masse du spécimen présent dans les images de projection uniformément sur les traces de rayons de projection calculés (*cf.* figure 2.6). De cette façon, la masse de l'échantillon est projetée de nouveau dans un volume de reconstruction. Ce processus est répété pour toutes les images de projection dans la série d'inclinaison, et les rayons de rétroprojection des images différentes se croisent et se renforcent les uns les autres dans les points où la vraie masse se trouve dans la structure d'origine. Par conséquent, la masse en 3D de l'échantillon est reconstruite à partir d'une série de projections 2D.

Afin de limiter le flou dans la reconstruction, différents filtres de pondération peuvent être multipliés à la reconstruction dans l'espace de Fourier. Le filtre le plus commun est le filtre de rampe  $|v|$ , où  $v$  représente la fréquence. L'allure d'un filtre rampe est représentée sur la figure 2.7. Ce filtre de rampe augmente les fréquences spatiales élevées et minimise les basses fréquences spatiales, c-à-d. qu'il corrige l'échantillonnage inégal. Cette approche de reconstruction est appelée la rétroprojection filtrée (RPF).





**FIGURE 2.6** — Rétroprojection directe (à gauche : acquisition, à droite : reconstruction avec présence d'artefacts en étoile autour du pixel central) [Tra13]



**FIGURE 2.7** — Représentation du filtre rampe

L'importance de la rétroprojection filtrée dans la tomographie électronique provient principalement de la linéarité et de la simplicité de calcul de la méthode. Les principaux inconvénients de la RPF sont [Bru02] :

- les résultats peuvent être fortement affectés par les données d'angle d'inclinaison manquantes,
- la rétroprojection filtrée ne prend pas en compte implicitement la fonction de transfert du microscope ou des conditions de bruit.

Il existe des algorithmes alternatifs de reconstruction de l'espace réel qui formulent le problème de la reconstruction 3D comme un grand système d'équations linéaires à résoudre par des méthodes itératives algébriques.

## 2.2.2 Reconstruction algébrique

### 2.2.2.1 Notion algébrique

Nous introduisons tout d'abord la définition de la projection tomographique : Soit  $f : \mathbb{R}^2 \rightarrow [0, 1]$ , une fonction intégrable à support compact, et soit  $\theta \in \mathbb{R}$ , la projection tomographique  $\mathcal{P}_y^\theta(f)$  définie par :

$$\mathcal{P}_y^\theta(f) = \int_{\mathbb{R}} f(R_\theta(x, y)) dy \quad (2.16)$$

où  $R_\theta$  est la rotation d'angle  $\theta$  autour de l'origine :

$$R_\theta(x, y) \rightarrow (x \cos \theta - y \sin \theta, x \sin \theta + y \cos \theta)$$

Maintenant, nous présentons le problème direct de projection :

$$\mathbf{p}^\theta = \mathcal{P}^\theta(\mathbf{f}) + \mathbf{br}^\theta \quad (2.17)$$

En tomographie, les mesures sont bruitées. Pour prendre en considération ce bruit, nous introduisons le terme complémentaire  $\mathbf{br}^\theta \in \mathbf{Br}$  pour chaque orientation.

On note  $f \in \mathbb{R}^{N_1} \times \dots \times \mathbb{R}^{N_n}$  l'image volumique si  $n = 3$  ou surfacique si  $n = 2$ . Soit  $\mathbf{N} = \prod_{d=1}^n N_d$ ,  $\mathbf{N}$  représente le nombre de voxels (*resp.* pixels) de l'image si  $n = 3$  (*resp.*  $n = 2$ ). Soit  $\mathbf{f} = (f_1, f_2, \dots, f_{\mathbf{N}})^T \in \mathbb{R}^{\mathbf{N}}$  le vecteur contenant toutes les valeurs de l'image  $f$  classées dans l'ordre lexicographique des arguments.

Soit  $\mathbf{M} = M_1 \times \dots \times M_{n-1}$  le nombre d'éléments de la projection de  $f$ , à une orientation  $\theta$  donnée de l'image, (*i.e.*  $n = 2$ ,  $\mathbf{M} = M_1$  et si  $n = 3$ ,  $\mathbf{M} = M_1 \times M_2$ ). Soit  $\mathbf{p}^\theta = (p_1^\theta, p_2^\theta, \dots, p_{\mathbf{M}}^\theta)^T$  le vecteur contenant tous les coefficients de la projection de  $f$  suivant  $\theta$  classés suivant l'ordre lexicographique. Notons que la dimensionalité de la projection est inférieure d'une unité à celle de l'image  $\mathbf{f}$ . Chaque  $\mathbf{p}$  est elle-même une composante du jeu de données englobant la totalité des  $\mathbf{S}$  projections, à toutes les orientations  $\theta_i \in \Theta$  utilisées, que l'on note  $\mathbf{P} = (\mathbf{p}^{\theta_1}, \mathbf{p}^{\theta_2}, \dots, \mathbf{p}^{\theta_i}, \dots, \mathbf{p}^{\theta_s})$ . L'ensemble  $\mathbf{P}$  est connu aussi sous le nom "sinogramme".

L'opérateur  $\mathcal{P}^\theta$  correspond au processus physique de projection appliqué sur l'objet  $\mathbf{f}$  pour obtenir les mesures  $\mathbf{p}^\theta$ . La modélisation de cet opérateur est nécessaire pour la résolution du problème inverse tomographique. La forme algébrique du problème modélise la projection sous sa forme discrète. En rappelant l'équation (2.16), la mesure  $\mathbf{p}^\theta$  présente l'intégrale de l'objet  $\mathbf{f}$  sur la trajectoire de l'électron partant de la source et passant par le pixel  $k$ , appelée aussi *ligne de projection*. Sur son trajet suivant un angle  $\theta$ , un électron traverse un ensemble  $K$  de voxels. Donc,  $\mathbf{p}^\theta$  est la somme sur cet ensemble d'intersections, où chaque intensité  $f(k)$  est multipliée par les valeurs respectives du coefficient de projection  $w_k$  :

$$\mathbf{p}^\theta = \sum_{k \in K} w_k \cdot f_k \quad (2.18)$$

Ensuite, il faut étendre cette expression à l'ensemble des faisceaux impactant chaque pixel de  $\mathbf{f}$ , pour tous les angles  $\theta$ , en collectant tous les coefficients de projection dans une seule matrice  $W$ , appelée *matrice de projection*. Nous obtenons ainsi le modèle global des données nécessaires à la reconstruction :

$$\mathbf{p} = W \cdot \mathbf{f} + \mathbf{B} \mathbf{r} \quad (2.19)$$

Dans la prochaine section, nous présenterons les méthodes proposées pour le calcul de la matrice  $W$ .

### 2.2.2.2 Matrice de projection

Le calcul de  $w_{ij}$ , la contribution de chaque voxel  $v_j$  de l'objet dans les projections, est fait grâce à l'interpolation du noyau d'interpolation de voxel par le faisceau de projection  $r_i$ . Une illustration de cette démarche est donnée par la figure 2.8.

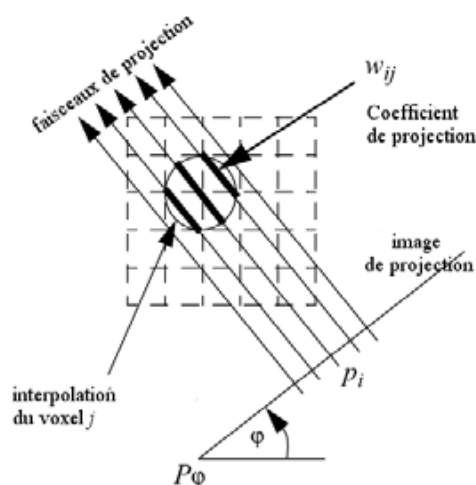


FIGURE 2.8 — L'interprétation du coefficient de poids de projection  $w_{ij}$  d'un voxel.

Une reconstruction de bonne qualité nécessite une modélisation précise de cette matrice de projection. Plusieurs méthodes ont été proposées dans la littérature afin de modéliser cette matrice. Les modèles standards tels que « voxel driven » et « ray driven » [Jos82] sont basées sur l'échantillonnage direct, ce qui donne des erreurs de modélisation et des artefacts sur l'image reconstruite. Le modèle « voxel driven » est basé sur la liaison de la source au plan de projection par une ligne passant au centre du voxel d'intérêt. Le modèle « ray driven » est basé sur la liaison entre la source et le centre de la cellule d'intérêt sur le plan de projection par une ligne passant par l'image (*cf.* figure 2.9(a) et figure 2.9(b)).

Nous pouvons également citer des modèles beaucoup plus avancés, tel que le modèle « distance driven » [MB04], qui définit la fonction compte tenu de la forme de représentation en escalier des voxels. Ce modèle aboutit à une meilleure modélisation. Cette fonction a pour rôle de mettre en correspondance les bornes de chaque voxel et chaque cellule du plan de projection sur une ligne commune ; la différence entre ces bornes définit les coefficients de projection (*cf.* figure 2.9(c)). Mesurer la zone exacte d'intersection est une tâche assez difficile. De ce fait, cette zone est approchée et utilisée comme un coefficient de projection. Ce cas de figure est illustré par la figure 2.9(c). Dans cet exemple, les pixels de l'image 2D sont

représentés par  $f_i$ ,  $i = 1, 2, 3$  et les cellules de détecteur sont représentées par  $p_j$ ,  $j = 1, 2, 3, 4$ . En projetant les pixels et les cellules sur la ligne commune, nous trouvons les coordonnées de projections des pixels qui sont  $x_n, x_{n+1}, x_{n+2}, x_{n+3}$ . De plus, nous trouvons aussi  $y_m, y_{m+1}, y_{m+2}, y_{m+3}$  qui sont les coordonnées de projection des cellules de détecteur. Donc, nous pouvons calculer la valeur de projection de cellule  $p_2$  comme suit [CLW<sup>+</sup>15] :

$$\Delta_{p_2} = \frac{(x_{n+1} - y_{m+1})f_1 + (y_{m+2} - x_{n+1})f_2}{y_{m+2} - y_{m+1}}$$

Néanmoins, une telle mise en correspondance fournit une représentation grossière de l'image en raison de son comportement anisotrope, provoquant des erreurs de modélisation. Ceci est dû au fait que le projecteur prend en considération seulement l'information spatiale de l'image sans l'intervention des données représentées dans l'image.

Récemment, Momey *et al.* [MDM<sup>+</sup>11] ont proposé l'utilisation de B-splines comme une alternative de l'approche de « distance driven ». Les B-Splines sont des fonctions polynomiales par morceaux, qui sont caractérisées par le degré des polynômes les constituant. Des travaux récents de la théorie de l'échantillonnage [TBU00] [Uns00] ont montré leur efficacité à représenter un signal continu, avec une bonne précision. L'augmentation de leur degré les rend de plus en plus semblables aux fonctions 3D gaussiennes, avec un comportement quasi isotrope, tout en gardant l'influence locale et la propriété de séparabilité. Une des améliorations les plus importantes données par la nouvelle approche « spline driven » proposée par Momey *et al.* [MTM<sup>+</sup>14] est la réduction de l'échantillonnage angulaire des projections sans aucune perte de qualité.

En effet, cette méthode est fondée sur l'idée de présenter les objets dans l'image par des B-splines au lieu d'utiliser la grille cubique classique. Même les lignes de projections sont modélisées par les B-splines. Cette modélisation améliore le calcul des coefficients de projection.

Dans nos travaux, nous utilisons la méthode « distance driven » pour modéliser la matrice  $W$ .

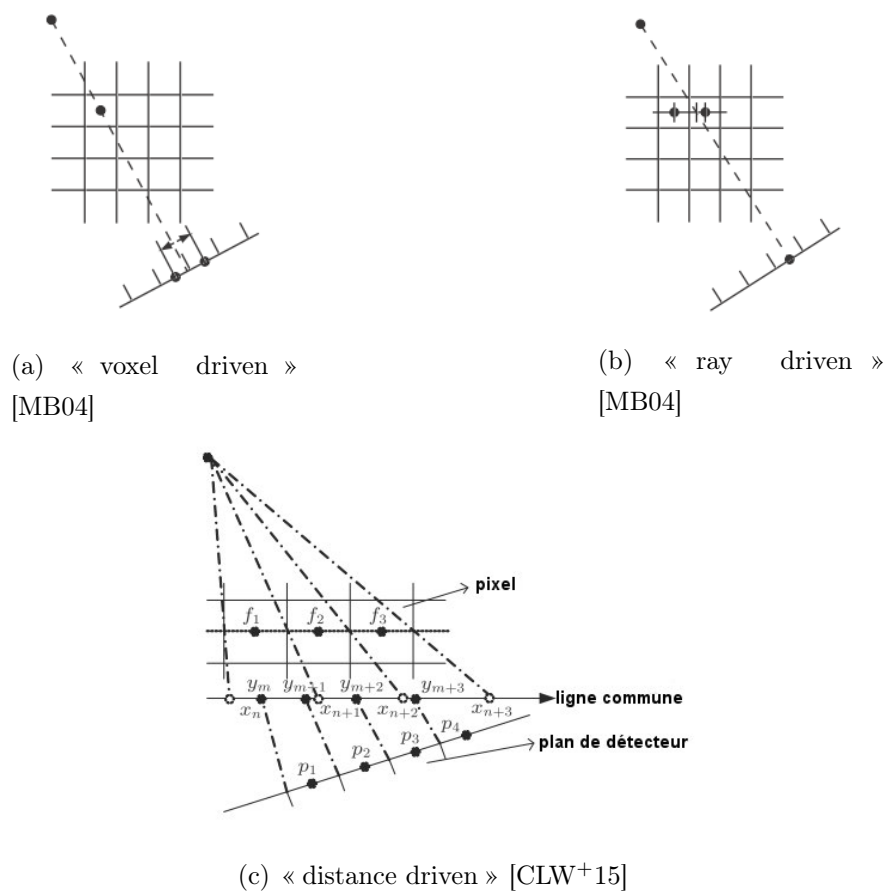


FIGURE 2.9 — Les différentes méthodes pour créer une matrice de projection.

Le principe de la reconstruction algébrique est de résoudre le système linéaire, ce qui se traduit par l'inversion directe de la matrice de projection. Cependant, cette solution n'est pas réalisable en pratique, en raison de la très grande taille de la matrice. En plus, les données expérimentales étant inévitablement bruitées, ce système d'équations peut être inconsistant ou indéterminé, i.e. qu'il n'admet pas en général une solution unique.

Pour toutes ces raisons, à l'inversion de cette matrice est substituée une méthode itérative. Plusieurs méthodes sont employées pour résoudre le problème.

### 2.2.2.3 Principe des techniques itératives algébriques

Nous introduisons dans ce qui suit le principe des techniques itératives algébriques de reconstruction, et particulièrement les méthodes ART, SIRT et SART.

Le pseudo code de l'algorithme général de la reconstruction algébrique est illustré par l'Algorithme.1. On note l'estimation initiale du volume à reconstruire par  $V^0$  et l'algorithme itère sur tous les pixels  $p_i$  de toutes les projections  $P$  jusqu'à ce que nous atteignons le seuil de terminaison. Les pixels sont divisés en  $m$  sous-ensembles de  $S$  et pour chaque sous-ensemble, une nouvelle estimation du volume est calculée.

La mise à jour du volume peut être divisée en trois phases : la projection du volume trouvé, la comparaison et la rétroprojection. En projetant l'objet, une simulation de l'acquisition de projection réelle est faite. Pour chaque pixel, un rayon est généré et trace son chemin à travers le volume pour collecter la valeur et le poids de chaque voxel frappé par ce rayon. Ainsi, la projection virtuelle pour chaque pixel est obtenue (*c.f.* figure.2.8). Le calcul de chaque pixel, l'erreur de sa projection virtuelle et de sa projection réelle sont réalisés au cours de l'étape de correction. Enfin, dans la rétroprojection, l'algorithme corrige la valeur de chaque voxel selon les erreurs calculées au niveau de tous les pixels qui contribuent au voxel.

Après le traitement de tous les pixels du sous-ensemble, une nouvelle estimation du volume est trouvée. En d'autres termes, l'estimation du volume  $V^k$ , où  $k$  représente le nombre de mises à jour, est obtenue en fonction du  $V^{k-1}$  et du sous-ensemble  $S$ . Il est à signaler qu'en règle générale, une mise à jour ne constitue pas une itération de l'algorithme. En outre, les méthodes ART, SIRT et SART diffèrent selon la formation des sous-ensembles.

#### 2.2.2.3.1 ART

La technique de reconstruction algébrique (ART), initialement proposée par Gordon et al. [GBH70]. ART est une méthode itérative, elle reconstruit un objet volumétrique par une séquence alternée de prévisions de volume et de correction de

---

**Algorithme 1** : L'algorithme général pour les techniques algébriques

---

Initialisation du volume

Diviser les pixels en sous-ensembles

**tant que** *non convergence* **faire**    **pour** *chaque sous-ensemble* **faire**        **pour** *les pixels de chaque sous-ensemble* **faire**

Projeter l'objet (Calculer la projection virtuelle)

L'étape de Comparaison (Calculer l'erreur)

Rétro-projection (Mise à jour du volume selon l'erreur)

rétroprojections. La correction dans l'algorithme ART est faite suivant un faisceau de projection à la fois. Donc, les pixels touchés par chaque faisceau de projection forment un sous-ensemble  $S$  de traitement. Ici, la projection du volume mesure à quel point l'état actuel du volume correspond à l'une des projections réelles, tandis que dans l'étape de rétroprojection, une image correctrice est distribuée sur la grille de volume. Pour un voxel  $x_j$  cette mise à jour peut être exprimée comme :

$$x_j^{t+1} = x_j^t + \lambda \frac{p_i - \sum_{n=1}^N w_{in} x_n^t}{\|w_{in}\|^2} w_{ij} \quad (2.20)$$

Plusieurs opérations de ce type sont généralement nécessaires pour rendre le volume reconstruit conforme aux détails de toutes les projections présentées dans l'ensemble acquis. D'autre part, une amélioration d'ART est présentée en forme de SART [AK84] (ART simultané) ; pour ART la correction du volume est basée sur des rayons, alors que, ART simultané corrige le volume seulement après le calcul de projection de l'image entière. SART sera présentée dans le paragraphe 2.21.

Le processus itératif de cette technique est assez lent. De ce fait, ce critère, à savoir, la vitesse de calcul, a jusqu'à présent empêché ART d'être utilisée dans des applications en temps réels. Cependant, ART possède de nombreux avantages sur la rétroprojection filtrée (RPF) : Il donne de meilleurs reconstructions quand un petit nombre de projections est disponible, lorsque les projections ne sont



pas réparties uniformément dans l'espace, ou lorsque les projections sont rares ou manquent à certaines orientations [KS01]. Cependant, cet algorithme souffre fortement du phénomène d'amplification du bruit [KS01]. Les techniques algébriques pour la reconstruction de la structure cellulaire ont été présentées dans [Fer04]. Ce travail a porté principalement sur ART en utilisant les blobs au lieu des simples voxels. Il est à noter qu'une approche similaire a déjà été décrite dans [MHC98]. Cependant, cette dernière porte sur la reconstruction dans l'analyse de particules isolées. Dans les deux travaux, les résultats obtenus avec ART étaient meilleurs que ceux obtenus avec RPF. Cette implantation d'ART a encore été améliorée au cours des années, en particulier en termes de réduction du temps nécessaire à la reconstruction [BCMS<sup>+</sup>09].

### 2.2.2.3.2 SIRT

De nos jours, la technique de reconstruction itérative simultanée (SIRT) représente la technique itérative la plus utilisée. SIRT est basée sur la reprojection de reconstruction en cours et la comparaison par rapport aux projections initiales. En prenant la projection de différence, une différence de reconstruction peut être obtenue pour corriger la reconstruction antérieure. Cette procédure est effectuée de manière itérative jusqu'à ce qu'une solution adéquate soit atteinte (figure 2.10). SIRT consiste à corriger un pixel  $x_j$  en utilisant simultanément tous les faisceaux qui le traversent. Le sous ensemble de correction ici contient tous les coefficients de projection  $w_{ij}$  qui appartiennent à ces faisceaux. Il y a différentes versions de l'algorithme SIRT [Gil72]. Nous citons les deux versions que nous utilisons dans nos travaux [Bon11] et [PBS11].

Nous rappelons tout d'abord la formule de base de SIRT :

$$\mathbf{x}^{(t+1)} = \mathbf{x}^{(t)} + \mathbf{W}^T(\mathbf{p} - \mathbf{W}\mathbf{x}^{(t)})$$

Où  $\mathbf{x}^{(t)}$  est la solution (l'image reconstruite obtenue) à la  $t$ -ième itération,  $\mathbf{p}$  est la projection obtenue avec le microscope,  $\mathbf{W}$  est la matrice de projection et

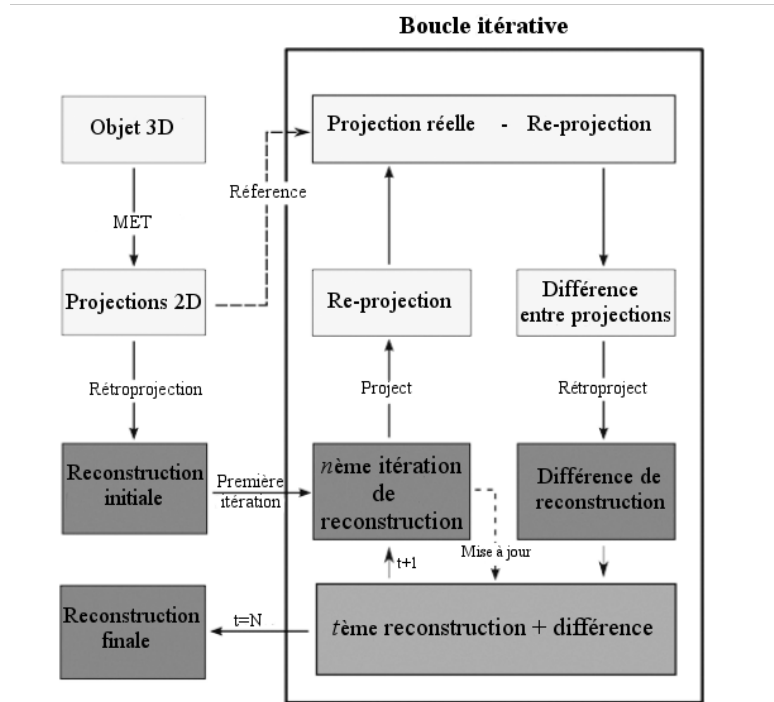


FIGURE 2.10 — Déroulement de l’algorithme de SIRT.

$\mathbf{W}^T$  est la matrice de rétroprojection.

La différence entre les deux versions réside dans la pondération de l’erreur dans chaque itération. Pour la première version, la formule est :

$$\mathbf{x}^{(t+1)} = \mathbf{x}^{(t)} + \lambda \mathbf{W}^T (\mathbf{p} - \mathbf{W} \mathbf{x}^{(t)})$$

où  $\lambda$  est l’inverse du carré de la première valeur propre de la matrice  $\mathbf{W}$  [Bon11].

Pour la deuxième version, la formule est :

$$\mathbf{x}^{(t+1)} = \mathbf{x}^{(t)} + \mathbf{C} \mathbf{W}^T \mathbf{R} (\mathbf{p} - \mathbf{W} \mathbf{x}^{(t)}),$$

où  $\mathbf{C}$  et  $\mathbf{R}$  sont des matrices diagonales contenant respectivement l’inverse de la somme des colonnes et des lignes de la matrice de projection, *i.e.*  $c_{jj} = 1 / \sum_i w_{ij}$  et  $r_{ii} = 1 / \sum_j w_{ij}$ . Ces matrices sont là pour compenser le nombre de lignes de projection qui sont passées par chaque pixel et le nombre de pixels qui sont touchés

par chaque ligne de projection [PBS11]. Bien que SIRT a été utilisé dans un grand nombre de paquets et de logiciels commerciaux [KMM96,FRP<sup>+</sup>96,BF11], il n'existe pas beaucoup de publications scientifiques concernant son efficacité. Cependant, [XXJ<sup>+</sup>10] ont modifié SIRT et ont proposé Ordered Subset SIRT (OS SIRT), un algorithme proposé pour l'architecture graphique (GPU) de calcul. Cette dernière a été comparée avec SIRT traditionnelle et SART et a été considérée comme étant beaucoup plus performante en termes de temps de calcul et de qualité.

### 2.2.2.3.3 SART

Andersen et Kak ont présenté l'ART simultané dans [AK84] comme un compromis entre l'ART et SIRT. Dans SART, un sous-ensemble  $S$  contient tous les pixels d'une projection  $\mathbf{p}$ . Pour un voxel  $x_j$  cette mise à jour peut être exprimée comme :

$$x_j^{t+1} = x_j^t + \lambda \frac{\sum_{p_i \in \mathbf{p}} \left( \frac{p_i - \sum_{n=1}^N w_{in} x_n^t}{\sum_{n=1}^N w_{in}} \right) w_{ij}}{\sum_{p_i \in \mathbf{p}} w_{ij}} \quad (2.21)$$

Au cours de la rétroprojection, les faisceaux de projection traversent encore une fois le volume, sauf que cette fois les facteurs de correction de ces faisceaux sont pondérés par les intégrales de tous les voxels et ajoutés à la valeur du voxel traité. Une normalisation est effectuée sur tous les faisceaux qui ont interagi avec le voxel en question.

En utilisant cette stratégie de mise à jour, SART profite des avantages des deux techniques précédentes. En effet, elle fournit une convergence rapide de l'ART avec des résultats comparables en qualité à SIRT [KS88]. Il est à signaler qu'il existe un seul travail présenté dans [WZL09] qui a été entièrement consacré à l'utilisation de SART en cryo-tomographie électronique. Les auteurs ont souligné que le volume initial arbitraire peut conduire à une convergence plus lente de l'algorithme et ont proposé SART modifié (MSART) qui ajoute deux modifications à la version originale de SART. Tout d'abord, au lieu d'utiliser un volume nul comme estimation initiale pour la reconstruction, le nouvel algorithme calcule la rétro-projection et l'utilise comme estimation initiale, ce qui devrait conduire à une convergence plus rapide de MSART. La deuxième modification est l'ajout d'un

autre facteur de pondération sur les données de l'équation (2.21) afin d'améliorer la qualité des reconstructions. Cependant, les résultats présentés montrent que les auteurs utilisaient plus que 100 itérations pour obtenir des reconstructions. Ce nombre est énorme puisque SART a été conçu pour produire des résultats de bonne qualité après seulement une itération [KS88], ce qui a été également vérifié empiriquement dans [DMF07, XXJ<sup>+</sup>10].

#### 2.2.2.4 Reconstruction par optimisation régularisée

Une autre façon de résoudre le problème (2.19) est l'utilisation des algorithmes d'optimisation. Plusieurs approches sont proposées dans ce domaine, nous citons deux approches *Maximum-Likelihood Expectation Maximization* (MLEM) [Kau93] et *Limited Memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* (L\_BFGS) [LN89]. L'objectif de MLEM est d'estimer  $\mathbf{f}$  qui peut produire les projections  $\mathbf{p}$  avec la plus forte probabilité. Ceci peut être réalisé en utilisant la loi de Poisson qui permet de prévoir la probabilité de la prochaine estimation de  $\mathbf{f}$ , étant donné la valeur moyenne des estimations précédentes. Ainsi, à chaque itération de l'algorithme est divisé en deux étapes [Kau93] :

- l'étape E : l'étape d'évaluation de l'espérance, la formule exprimant la probabilité d'une image reconstruite est calculée en tenant compte des dernières estimations trouvées,
- l'étape M : dans l'étape de maximisation, les pixels qui ont la plus grande probabilité de maximiser la différence de (2.19) sont sélectionnés.

Une autre modélisation du MLEM pour la reconstruction tomographique a été proposée dans [Gre90] où l'équation à traiter est formulée comme suite :

$$\mathbf{f}^{k+1} = \mathbf{f}^k \times \text{rétroprojection normalisée de } \frac{\text{projections réelles}}{\mathbf{p}^k} \quad (2.22)$$

Cette modélisation exige entre 50 et 200 itérations pour que l'algorithme converge. Pour cette raison, Hudson et Larkin [HL94] ont proposé l'algorithme *Ordered-Subsets Expectation Maximization* (OSEM) pour accélérer le processus de reconstruction en utilisant l'algorithme MLEM. Avec cette méthode, l'ensemble des

projections est divisé en sous-ensembles (ou blocs). Le MLEM est ensuite appliqué à chaque sous-ensemble à tour de rôle, en tant que sous-itération. Une itération complète est réalisée lorsque tous les sous-ensembles ont été traités.

L\_BFGS [LN89] est une variante de l'algorithme quasi-Newton, qui est une méthode d'optimisation utilise la matrice Hessienne (la dérivée du second degré) de la fonction pour déterminer le bon pas de déplacement suivant la direction choisie vers l'optimum de l'espace de recherche. La matrice Hessienne est calculée pour une seule fois dans la première itération. À chaque nouvelle itération de l'algorithme, la nouvelle matrice sera estimée. Dans BFGS, qui est considéré comme la version la plus efficace de quasi-Newton, l'inverse de la matrice Hessienne est utilisé. Pour les problèmes de grande taille, L\_BFGS résout le problème de l'estimation de la matrice inverse pour la prochaine itération en stockant ses approximations des itérations précédentes sous une forme compressée qui nécessite le stockage seulement d'un nombre constant de vecteurs. En fait, L\_BFGS enregistre uniquement les mises à jour de quelques dernières itérations, donc des informations qui précèdent ces itérations sont perdues.

En fait, les images reconstruites obtenues en utilisant l'optimisation ont tendance à devenir bruitées que le nombre d'itérations augmente, parce que les images reconstruites bruitées peuvent donner des projections qui sont très proches des projections bruitées mesurées. L'introduction d'une connaissance préalable comme une contrainte qui peut favoriser la convergence du processus d'optimisation est appelée régularisation. La régularisation est basée sur l'hypothèse selon laquelle des informations *à priori* peuvent être connues et représentent les propriétés physiques ou morphologiques de l'objet. Généralement, la régularisation est choisie pour pénaliser les images bruitées [FGCU16]. Nous pouvons réécrire l'équation (2.19) pour que la reconstruction soit une minimisation du critère du moindre carré régularisé  $J(\mathbf{f})$  suivant :

$$\mathbf{f}^* = \underset{\mathbf{f}}{\operatorname{argmin}} J(\mathbf{f}) = \underset{\mathbf{f}}{\operatorname{argmin}} J_{\text{data}}(\mathbf{f}) + \lambda J_{\text{priori}}(\mathbf{f}) \quad (2.23)$$

où  $J_{\text{data}}(\mathbf{f})$  présent la distance euclidienne normalisée  $\|\mathbf{p} - W\mathbf{f}\|^2$ ,  $J_{\text{priori}}(\mathbf{f})$  est la terme de régularisation, et  $\lambda > 0$  un paramètre de régularisation permettant d'ajuster le compromis entre  $J_{\text{data}}(\mathbf{f})$  et  $J_{\text{priori}}(\mathbf{f})$ .

Plusieurs types de régularisation ont été proposés dans la littérature. Dans le domaine tomographique, l'efficacité d'un type de régularisation, appelé variation totale (TV), à attirer l'attention des chercheurs [GdBB<sup>+</sup>12]. La TV a prouvé son efficacité pour supprimer des artefacts tout en préservant les formes dans l'image, en utilisant les informations de contours dans les dérivées de l'image [MBG<sup>+</sup>14]. La formule de TV pour l'image  $\mathbf{f}$  s'écrit sous la forme :

$$TV(\mathbf{f}) = \int \|\nabla\mathbf{f}\|_2 dx dy = \int \sqrt{(\nabla_x\mathbf{f})^2 + (\nabla_y\mathbf{f})^2} dx dy \quad (2.24)$$

*Fourier-based Iterative Reconstruction Method* (FIRM) est une approche hybride entre la reconstruction analytique et algébrique qui est proposée par Wang *et al.* [WSS13]. Cette approche utilise le gradient conjugué, un algorithme d'optimisation, pour reconstruire l'image. La nouveauté de FIRM est l'utilisation de NUFFT pour calculer la rétroprojection et le noyau de convolution utilisés dans l'optimisation, ce qui permet de gagner en temps de calcul.

### 2.2.2.5 Évaluation des algorithmes de reconstruction

Une reconstruction d'un volume synthétique en niveaux de gris contenant plusieurs sphères ( $256 \times 256 \times 256$  pixels) est faite. La figure 2.11(a) illustre une coupe transversale du volume, orthogonale à l'axe d'inclinaison. La série de projections contient 70 images qui sont projetées de  $-70^\circ$  à  $70^\circ$  avec un pas angulaires de  $+2^\circ$ . Les figures 2.11(b-f) représentent la coupe correspondante dans le volume reconstruit avec RPF, ART, SIRT, SART et reconstruction par optimisation avec variation totale (TV). La méthode de reconstruction par optimisation avec variation totale donne le résultat qui présente le moins d'artefacts sur les bords, en particulier, ceux dus aux projections manquantes. À la deuxième place, nous trouvons la méthode SIRT, suivie par SART.

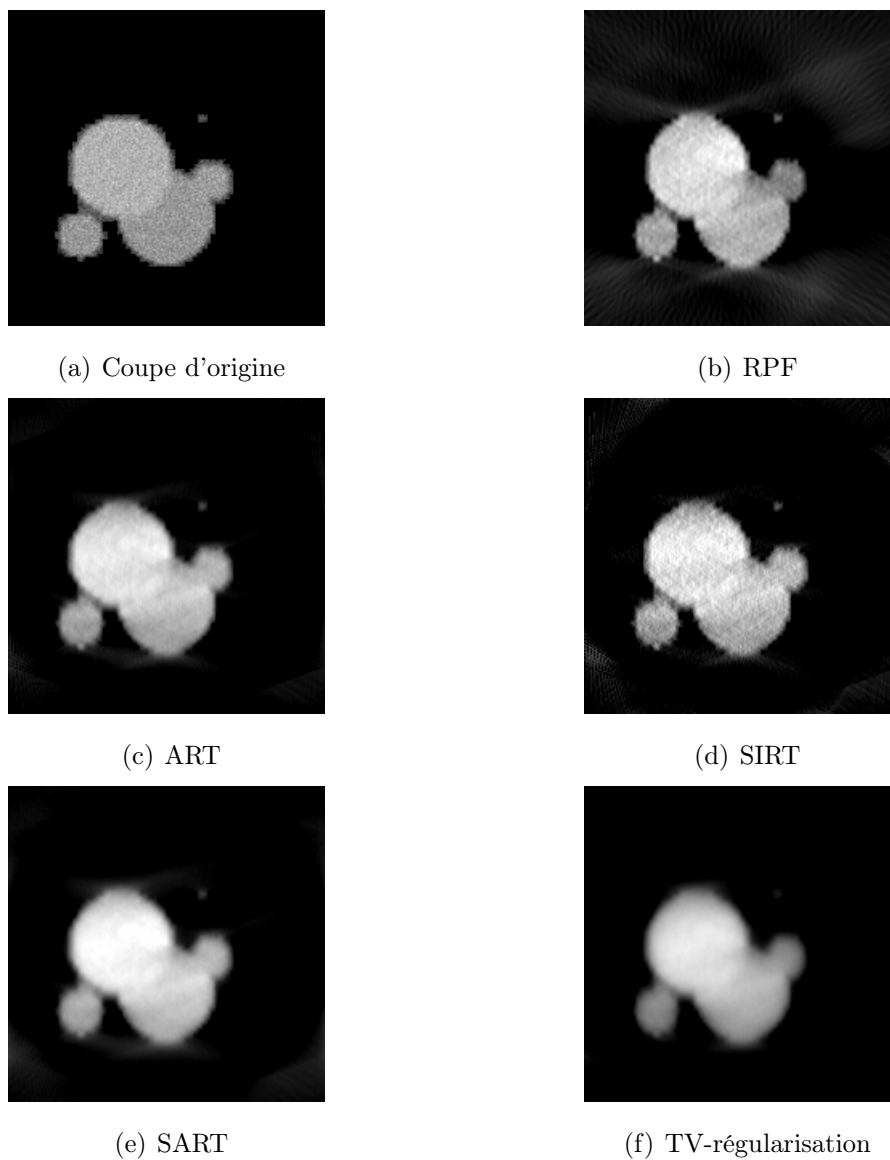


FIGURE 2.11 — Reconstruction avec les algorithmes de l'état de l'art.

## Conclusion

Nous avons présenté au cours de ce chapitre l'état de l'art relatif aux étapes d'alignement et de reconstruction d'un objet tomographique 3D. Les approches

d'alignement proposées dans la littérature, utilisent des marqueurs de référence (des nanoparticules d'or) afin d'obtenir un alignement correct des images. En l'absence des marqueurs, l'alignement des projections est possible via la corrélation entre deux images acquises avec des angles d'inclinaison successifs. Néanmoins, les approches basées sur la corrélation des images 2D ne sont pas efficaces pour estimer correctement les facteurs de transformations géométriques de l'objet en espace 3D ainsi que l'incertitude des orientations d'acquisition utilisées.

Concernant l'étape de reconstruction, nous avons exposé les deux types de reconstruction (analytique et algébrique) et nous avons mis l'accent sur les avantages et les inconvénients de chacune d'entre elles.

Dans le prochain chapitre, nous allons définir notre approche qui traite simultanément l'alignement et la reconstruction de l'objet 3D dans son espace natif.



Chapitre

# 3

---

## Alignement et reconstruction 3D par optimisation simultanée

### Introduction

Après une étude sur le modèle du problème direct, nous proposons une approche de reconstruction tomographique qui traite simultanément les erreurs de l'objet reconstruit ainsi que les orientations utilisées. En effet nous ne disposons pas réellement de l'objet en question mais uniquement de ses projections. Dans ce cas, pour juger la qualité de l'objet reconstruit, nous allons comparer les projections réelles de l'objet avec les projections de l'objet reconstruit. Ces projections sont obtenues en projetant ce dernier suivant l'ensemble des orientations utilisées.

Nous allons présenter au cours de ce chapitre la méthodologie choisie pour le traitement des orientations erronées. Nous allons en premier lieu, définir la méthodologie de correction des orientations pour le cas 2D pour ensuite, passer à la généralisation du cas 3D en incluant la correction des translations géométriques.

### 3.1 Réduction de l'incertitude angulaire et l'amélioration de la reconstruction 3D par coupe

Notre approche de correction est basée sur la minimisation d'une fonction de coût ayant comme paramètre l'ensemble des orientations. Pour obtenir plus de précision, nous incluons également l'objet reconstruit en tant que deuxième paramètre de la fonction de coût. En utilisant simultanément ces deux ensembles de paramètres, nous pouvons fournir des résultats plus précis qu'en traitant séparément l'optimisation de l'incertitude angulaire et l'objet reconstruit.

Pour ce faire, nous définissons la fonction de coût  $\mathcal{C}$ , qui est fonction de la distance euclidienne entre les projections réelles  $\mathbf{\Pi}$  et les projections de l'objet reconstruit  $\mathbf{P}$ .

$$\mathcal{C}(\mathbf{f}, \Theta) = \frac{1}{2} \|\mathbf{\Pi} - \mathbf{P}\|_2^2 = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \|\boldsymbol{\pi}^i - \mathbf{p}^{\theta_i}\|_2^2 \quad (3.1)$$

Cette équation peut se développer comme suit :

$$\mathcal{C}(\mathbf{f}, \Theta) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} (\pi_j^i - p_j^{\theta_i})^2 = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} \left( \pi_j^i - \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{\theta_i, j} f_k \right)^2 \quad (3.2)$$

où  $w_k^{\theta_i, j}$  est le coefficient de projection du pixel  $k$  par la ligne de projection  $j$  suivant l'angle  $\theta_i$ .

La fonction de coût  $\mathcal{C}$  dépend de deux paramètres, à savoir, les projections réelles, le volume actuel reconstruit et les orientations actuelles.

Nous utilisons le carré pour assurer la positivité de la fonction. La ressemblance entre les deux types de projections atteint son maximum lorsque la fonction  $\mathcal{C}$  atteint son minimum. Dans ce cas, la solution  $(\widehat{\mathbf{f}}, \widehat{\Theta})$  de notre problème est :

$$(\widehat{\mathbf{f}}, \widehat{\Theta}) = \operatorname{argmin} \mathcal{C}(\mathbf{f}, \Theta) \quad (3.3)$$

L'équation (3.3) est convexe en  $\mathbf{f}$  (à cause de la somme quadratique utilisée)

et  $\Theta$  est proche de la solution par hypothèse. Nous supposons que sous cette hypothèse, le problème d'optimisation de l'éq. (3.3) est convexe.

Plusieurs méthodes d'optimisation existent dans la littérature [NW06]. Les méthodes déterministes sont des méthodes itératives basées sur le calcul du gradient. Ces méthodes convergent rapidement vers un optimum. Cependant, elles ne certifient pas que l'optimum atteint est un optimum global, car elles ne sont pas aussi robustes à l'initialisation que les méthodes d'optimisation stochastique. De plus, l'inconvénient majeur de ces méthodes réside dans le nombre important d'évaluations nécessaires et leur temps de convergence. Plusieurs algorithmes déterministes ont été introduit dans la littérature. Nous citons les plus connus, le gradient conjugué (GC) [HS52] et le quasi-Newton [Dav91]. Ce dernier est très efficace en terme de vitesse de convergence, mais il nécessite le calcul de la matrice Hessienne de la fonction, contrairement au GC qui nécessite seulement le calcul du gradient. Même avec les méthodes d'approximation de la matrice Hessienne et les nouvelles méthodes de stockage proposées, il reste très difficile d'appliquer le quasi-Newton pour notre cas. Ceci est dû au grand nombre de variables utilisées dans notre fonction ( $\mathbf{f}$  et  $\Theta$  sont respectivement de taille  $\mathbf{N}$  et  $\mathbf{M}$ ). Pour cette raison, nous choisissons la méthode du GC. L'ensemble  $\Theta$  rend la fonction  $\mathcal{C}$  non linéaire. Nous allons travailler avec la version non linéaire de l'algorithme du gradient [DY99]. Le processus du gradient conjugué est illustré dans la figure 3.1.

Les étapes ci-dessous constituent une itération de déplacement le long d'une direction conjuguée  $d_i$ , après une initialisation de  $d_0 = g_0 = -\nabla\mathcal{C}(\chi_0)$  [DY99] :

- trouver  $\alpha_i$  la longueur du pas de descente qui minimise  $\mathcal{C}(\chi_i + \alpha_i d_i)$ ,
- $\chi_{i+1} = \chi_i + \alpha_i d_i$ ,
- $g_{i+1} = -\nabla\mathcal{C}(\chi_{i+1})$ ,
- $\beta_{i+1} = \max\left\{\frac{g_{i+1}^T(g_{i+1}-g_i)}{g_i^T g_i}, 0\right\}$ ,
- mettre à jour la direction conjuguée  $d_{i+1} = g_{i+1} + \beta_{i+1} d_i$ .

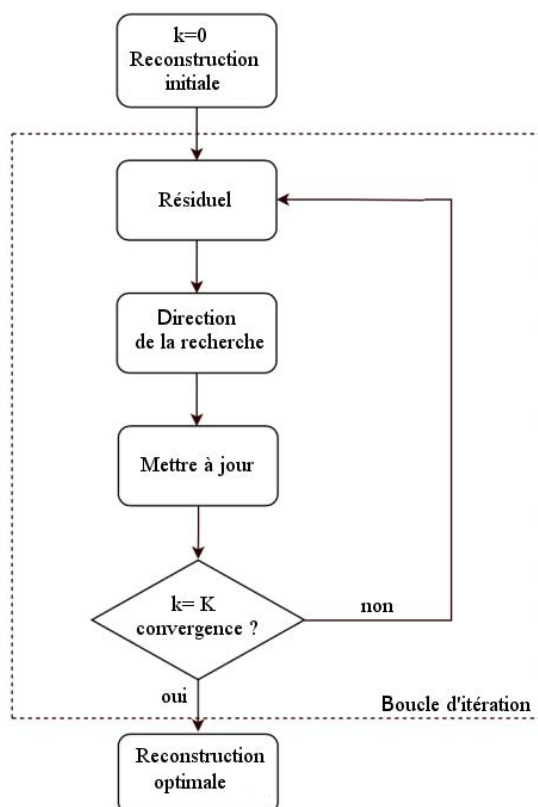


FIGURE 3.1 — Processus du gradient conjugué

La première étape pour utiliser le GC est de calculer le gradient de notre fonction de coût. Pour faciliter cette phase, écrivons l'équation (3.2) sous la forme :

$$\mathcal{C}(\mathbf{f}, \Theta) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^S \sum_{j=1}^M (\mathcal{C}_r(\mathbf{f}, \theta_{i,j}))^2 \quad (3.4)$$

avec  $\mathcal{C}_r(\mathbf{f}, \theta_{i,j}) = \pi_j^i - \sum_{k=1}^N w_k^{\theta_{i,j}} \mathbf{f}_k$ .

Maintenant, nous calculons le gradient de  $\mathcal{C}_r$ , ensuite, nous déduisons le gradient de  $\mathcal{C}$ . À cause de la nature discrète de la fonction de coût, nous utilisons la différence finie pour approcher le gradient.

### 3.1.1 Dérivée partielle par rapport à $f$

Nous commençons par :

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial \mathcal{C}r}{\partial f_h} &= \lim_{\Delta_f \rightarrow 0} \frac{\mathcal{C}r(f_1, f_2, \dots, f_h + \Delta_f, \dots, f_N, \theta_i, j) - \mathcal{C}r(f_1, f_2, \dots, f_h - \Delta_f, \dots, f_N, \theta_i, j)}{2\Delta_f} \\
 &\approx \frac{1}{2\Delta_f} \left( \pi_j^i - \left( \sum_{k=1}^{h-1} w_k^{\theta_i, j} f_k + w_h^{\theta_i, j} (f_h + \Delta_f) + \sum_{k=h+1}^N w_k^{\theta_i, j} f_k \right) \right) - \\
 &\quad \frac{1}{2\Delta_f} \left( \pi_j^i - \left( \sum_{k=1}^{h-1} w_k^{\theta_i, j} f_k + w_h^{\theta_i, j} (f_h - \Delta_f) + \sum_{k=h+1}^N w_k^{\theta_i, j} f_k \right) \right) \\
 &\approx -w_h^{\theta_i, j}
 \end{aligned}$$

Nous avons donc,

$$\frac{\partial (\mathcal{C}r)^2}{\partial f_h} \approx -2w_h^{\theta_i, j} \left( \pi_j^i - \sum_{k=1}^N w_k^{\theta_i, j} f_k \right).$$

Donc,

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial f_h} \approx - \sum_{i=1}^S \sum_{j=1}^M w_h^{\theta_i, j} \left( \pi_j^i - \sum_{k=1}^N w_k^{\theta_i, j} f_k \right).$$

Nous remarquons la disparition du terme  $\Delta_f$ , cela signifie que le calcul de  $\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial f_h}$  dépend seulement des coefficients de projections liés au  $f_h$ , i.e.  $w_h^{\theta_i, j}$ .

### 3.1.2 Dérivée partielle par rapport à $\Theta$

Nous calculons maintenant la dérivée partielle par rapport aux  $\theta_i$ .

$$\begin{aligned} \frac{\partial \mathcal{C}r}{\partial \theta_h} &= \lim_{\Delta\theta \rightarrow 0} \frac{\mathcal{C}r(\mathbf{f}, \theta_h + \Delta\theta, j) - \mathcal{C}r(\mathbf{f}, \theta_h - \Delta\theta, j)}{2\Delta\theta} \\ &\approx \frac{1}{2\Delta\theta} \left( \pi_j^h - \left( \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{(\theta_h + \Delta\theta), j} \mathbf{f}_k \right) - \pi_j^h + \left( \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{(\theta_h - \Delta\theta), j} \mathbf{f}_k \right) \right) \\ &\approx \frac{1}{2\Delta\theta} \left( \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{(\theta_h - \Delta\theta), j} \mathbf{f}_k - w_k^{(\theta_h + \Delta\theta), j} \mathbf{f}_k \right) \\ &\approx \frac{1}{2\Delta\theta} \left( \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} (w_k^{(\theta_h - \Delta\theta), j} - w_k^{(\theta_h + \Delta\theta), j}) \mathbf{f}_k \right) \end{aligned}$$

où  $w_k^{(\theta_h + \Delta\theta), j}$ ,  $w_k^{(\theta_h - \Delta\theta), j}$  sont les coefficients suivant les angles  $\theta_h + \Delta\theta$ ,  $\theta_h - \Delta\theta$ .

Nous avons donc,

$$\frac{\partial (\mathcal{C}r)^2}{\partial \theta_h} \approx \frac{1}{\Delta\theta} \left( \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} (w_k^{(\theta_h - \Delta\theta), j} - w_k^{(\theta_h + \Delta\theta), j}) \mathbf{f}_k \right) \left( \pi_j^i - \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{\theta_i, j} \mathbf{f}_k \right).$$

Donc,

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial \theta_h} \approx \frac{1}{2\Delta\theta} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} \left( \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} (w_k^{(\theta_h - \Delta\theta), j} - w_k^{(\theta_h + \Delta\theta), j}) \mathbf{f}_k \right) \left( \pi_j^i - \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{\theta_i, j} \mathbf{f}_k \right).$$

### 3.1.3 Algorithme de raffinement

Après le calcul du gradient, nous pouvons passer à la phase d'optimisation. Tout d'abord, nous faisons une reconstruction initiale, *i.e.* le point de départ de l'algorithme. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser la méthode de reconstruction algébrique SIRT pour cette phase. Cependant, tout type d'algorithme (analytique ou algébrique) peut être utilisé. Deuxièmement, nous prenons l'objet reconstruit initial et les données de projection avec les orientations utilisées dans l'acquisition comme entrée pour l'algorithme GC itératif. La sortie du procédé décrit est un objet reconstruit plus précis et une amélioration des orientations. L'algorithme de notre approche est présenté par Algorithme 2 [RBN<sup>+</sup>16a].

---

**Algorithme 2** : L'algorithme de raffinement par GC
 

---

**Données** :  $\mathbf{f}^{init}$ ,  $\Theta^{init}$ ,  $\Pi$ 

 initialisation  $\mathbf{f}_0^{iter} = \mathbf{f}^{init}$ ,  $\Theta_0^{iter} = \Theta^{init}$ ,  $iter_{max}$ ,  $iter = 0$ ,  $cond = 0$ 
**tant que**  $iter < iter_{max}$  *ET*  $cond=0$  **faire**

 | calculer gradient  $\nabla \mathcal{C}(\mathbf{f}_{iter}, \Theta_{iter})$ 

 | calculer  $\mathbf{f}_{iter+1}, \Theta_{iter+1}$  avec le gradient conjugué

 | calculer  $\Delta \mathcal{C} = \mathcal{C}(\mathbf{f}_{iter}, \Theta_{iter}) - \mathcal{C}(\mathbf{f}_{iter+1}, \Theta_{iter+1})$ 

 | **si**  $\Delta \mathcal{C} < \varepsilon$  **alors**

 | |  $cond=1$ 

 |  $\mathbf{f}_{iter} \leftarrow \mathbf{f}_{iter+1}, \Theta_{iter} \leftarrow \Theta_{iter+1}, iter \leftarrow iter + 1$ 
**Résultats** :  $\mathbf{f}_{iter+1}, \Theta_{iter+1}$ 


---

Nous avons appliqué cette démarche sur les coupes 2D d'un objet 3D. Le résultat est présenté dans la section 3.3.

### 3.1.4 Optimisation tridimensionnelle par coupes 2D

La fonction de coût  $\mathcal{C}$  présentée et son gradient sont utilisables en 2D ainsi qu'en 3D. Cependant, ils nécessitent une matrice de projection pour chacune de ces dimensions.

Lors du développement de la matrice de projection 3D (*cf.* figure 3.2(b)), nous avons appliqué notre approche d'optimisation à l'aide de la matrice de projection 2D (*cf.* figure 3.2(c)). Le MET utilise une géométrie parallèle pour acquérir les images, *i.e.* les faisceaux d'électrons traversant l'échantillon sont de forme parallèle. En négligeant les perturbations sur l'axe de rotation, la reconstruction peut être réalisée par plans de coupes 2D successives (*cf.* figure 3.2(a)). Donc, nous proposons une deuxième fonction de coût  $\mathcal{C}_2$ .

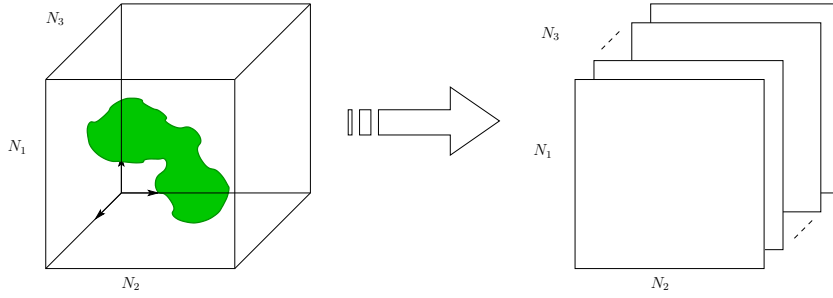
$$\mathcal{C}_2(\mathbf{F}, \Theta) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} \sum_{z=1}^{N_3} \left( \pi_{j,z}^i - \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{\theta_{i,j}} \mathbf{f}_k^z \right)^2 \quad (3.5)$$

où  $\mathbf{F} = (\mathbf{f}^1, \mathbf{f}^2, \dots, \mathbf{f}^{N_3})$  est l'ensemble de coupes 2D de l'objet 3D à reconstruire.

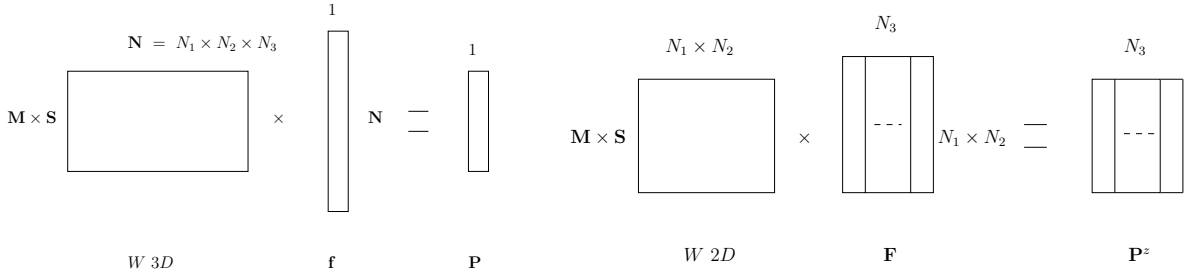
Les dérivées partielles de la fonction  $\mathcal{C}_2$  sont :

$$\frac{\partial \mathcal{C}_2}{\partial \mathbf{f}_h^z} \approx - \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} w_h^{\theta_{i,j}} \left( \pi_{j,z}^i - \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{\theta_{i,j}} \mathbf{f}_k^z \right)$$

$$\frac{\partial \mathcal{C}_2}{\partial \theta_h} \approx \frac{1}{2\Delta\theta} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} \sum_{z=1}^{\mathbf{N}_3} \left( \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} (w_k^{(\theta_h - \Delta\theta),j} - w_k^{(\theta_h + \Delta\theta),j}) \mathbf{f}_k^z \right) \left( \pi_{j,z}^i - \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{\theta_{i,j}} \mathbf{f}_k^z \right)$$



(a) Découpage du volume 3D en des coupes 2D



(b) Projection 3D en utilisant une matrice de projection 3D

(c) Projection 3D en utilisant une matrice de projection 2D

FIGURE 3.2 — Projection du volume 3D.

L'évaluation de notre approche dans les cas 2D et 3D par coupe est donnée respectivement dans la section 3.3.2 et 3.3.3. De ces résultats, nous déduisons que l'approche 3D par coupes permet d'améliorer les angles de rotation et la qualité de l'image reconstruite. Cependant, dans le cas où les erreurs sur l'axe de rotation ne seraient pas négligées, la reconstruction par coupe ne peut pas être réalisée. Pour ces raisons, nous présentons dans la prochaine section notre approche d'alignement-reconstruction 3D directe.



## 3.2 Alignement et reconstruction 3D multi-échelle conjointe pour cryo tomographie électronique

Le plus qu'apporte notre approche réside dans la capacité à traiter plusieurs types de corrections simultanément. L'importance de cette propriété apparaît lorsque les erreurs sur l'axe de rotation ne sont pas négligées. Dans ce cas, il n'est pas possible de corriger l'objet par coupe. Donc, une correction globale de l'objet devient une nécessité. Cette correction est possible à travers l'utilisation de trois angles pour modéliser la rotation suivant les trois axes de l'espace 3D.

Ceci est visualisé dans l'équation (3.6), où nous utilisons une matrice de projection avec les trois angles de rotation d'Euler. Par cette nouvelle fonction de coût, nous sommes capables de corriger les erreurs d'orientation du porte-objet, ainsi que les rotations possibles suivant l'angle  $\gamma_p$  (cf. figure 1.15). Dans ce cas, les orientations  $\Theta$  sont modélisées par les deux ensembles des angles  $\alpha$  et  $\beta$ , la rotation sur le plan de détecteur est représentée par  $\gamma$ .

$$\mathcal{C}(\mathbf{f}, \boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma}) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} (\pi_j^i - p_j^i)^2 = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} \left( \pi_j^i - \sum_{k=1}^{\mathbf{N}} w_k^{i,j} f_k \right)^2 \quad (3.6)$$

où  $w_k^{i,j}$  est le coefficient de projection du pixel  $k$  par la ligne de projection  $j$  suivant le triplet d'angle  $\alpha_i, \beta_i, \gamma_i$ . Cette méthodologie sera présentée dans la section qui suit.

La reconstruction 3D en cryo-tomographie électronique est réalisée à partir d'images sous projection de différents angles d'inclinaison. Le désalignement de ces images dégrade la qualité de l'objet reconstruit. Il existe de nombreuses techniques d'alignement pour faire face à ce problème. Leur principe réside dans le fait de corriger la transformation géométrique 2D dans les images de projection. Néanmoins, les erreurs d'acquisition peuvent produire des déplacements du porte-objet qui ne se traduisent pas par des transformations affines 2D des images de projection. Un exemple de ce type d'erreur est les changements d'axe de rotation. Dans

cette section, nous allons présenter notre approche multi-échelle basée sur une optimisation par gradient conjugué d'une fonction de coût. Cette dernière possède comme entrées : la reconstruction 3D, les images de projection et les angles d'acquisition. L'objectif principal de cette optimisation réside dans le fait de trouver tous les paramètres 3D de la transformation géométrique.

### 3.2.1 Transformations géométriques

Durant la phase d'acquisition, plusieurs problèmes peuvent subvenir, particulièrement, le mouvement du spécimen. Deux sortes de mouvements peuvent être considérés lors du déplacement du spécimen : la translation et la rotation en 3D.

#### 3.2.1.1 Translation en 3D

Rappelons que le repère d'acquisition du microscope est composé d'un plan perpendiculaire au faisceau électronique  $(OX, OY)$  et d'un axe focal  $(OZ)$  (*cf.* figure.1.15). L'image peut se déplacer dans  $(OX, OY)$ , ce qui conduit au même déplacement sur le plan du détecteur (i.e. l'image de projection). Le déplacement de l'image en fonction de  $(OZ)$  affectera l'échelle de l'objet projeté dans l'image de projection. En d'autres termes, la translation 3D de l'objet affecte en même temps la translation et la mise en échelle 2D de l'image de projection. Nous commençons notre approche par une estimation de l'objet 3D. De ce fait, nous pouvons corriger la translation et la mise en échelle des images de projections directement avec la translation sur l'objet 3D. Dans l'espace continu, la translation 3D est définie comme suit (en coordonnées homogènes) :

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \\ z' \\ 1 \end{pmatrix}_{(OX'Y'Z')} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & tx \\ 0 & 1 & 0 & ty \\ 0 & 0 & 1 & tz \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \\ 1 \end{pmatrix}_{(OXYZ)} \quad (3.7)$$

Où  $(x, y, z, 1)^T$  et  $(x', y', z', 1)^T$  sont respectivement le système de coordonnées  $(OXYZ)$  and  $(OX'Y'Z')$ . Ces transformations vont perturber la discrétisation de

l'espace de reconstruction. Pour cette raison, nous utilisons l'interpolation B-spline [TBU00] afin de corriger ce problème et assurer une bonne discrétisation de l'espace. En outre, afin de garder le système matriciel du modèle algébrique utilisé dans notre fonction d'optimisation, nous devons adapter le système de translation de coordonnées de pixels vers un système de translation matricielle direct des valeurs des voxels. En d'autres termes, nous définissons une matrice dont la multiplication directe avec l'objet 3D produira un objet 3D translaté suivant les paramètres de translation choisis.

$$\mathbf{f}^i = \mathbf{T}(tx_i, ty_i, tz_i)\mathbf{f}, \quad i \in [1, \dots, |\Theta|] \quad (3.8)$$

Où chaque ligne de  $\mathbf{T}$  décrit l'équation de la translation 3D de l'objet dans son espace en fonction de  $(tx_i, ty_i, tz_i)$ , qui est directement interpolé avec une B-spline. La  $k$ ème ligne de  $\mathbf{T}$  contient les coefficients de translation interpolés pour trouver le voxel  $f_k^i$ .

### 3.2.1.2 Rotation en 3D

Mis à part le problème de l'incertitude des orientations mentionné dans la section précédente, il est possible que l'objet fasse des rotations autour du plan de détecteur  $(OX, OY)$  lors de l'élévation de l'angle d'inclinaison. Ces deux types de rotations peuvent être présentés par le système des trois angles d'Euler  $(\alpha, \beta, \gamma)$ . En utilisant le même principe mathématique évoqué dans la section précédente, nous pouvons également modéliser la rotation 3D. En effet, au lieu d'appliquer la rotation sur l'objet lui-même, nous allons l'appliquer directement sur les lignes de projections. À cette effet, nous utilisons une matrice  $\mathbf{W}$  de taille  $\mathbf{M} \times \mathbf{N}$ , laquelle projette le vecteur de l'objet  $\mathbf{f}$  vers le vecteur de projection  $\mathbf{p}^i$  suivant l'orientation décrite par le triplet  $(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i)$  comme suit :

$$\mathbf{p}^i = \mathbf{W}(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i)\mathbf{f} \quad (3.9)$$

Comme la matrice de projection utilisée dans le cas 2D, les coefficients de

chaque ligne de cette matrice  $W$  sont les poids de projection des voxels qui interagissent avec le faisceau de projection qui lui correspond. Le calcul de cette matrice est réalisé selon le modèle « distance driven » pour le cas 3D.

Il faut mentionner que, même si les deux matrices  $T$  et  $W$  sont énormes, elles sont creuses.

### 3.2.2 Fonction de coût 3D globale

Soulignons que l'objectif de nos travaux de recherche est de corriger toutes les erreurs géométriques possibles qui peuvent avoir lieu dans l'étape de reconstruction. Les données d'entrée représentent un ensemble d'angles d'inclinaison incertains et les images réelles de projection correspondantes. Par conséquent, nous proposons d'utiliser une fonction qui mesure la distance entre les données réelles de projection et les données de projection trouvées après re-projection du volume reconstruit selon le triplet d'orientation courant lors de chaque itération.

Ainsi, en affinant tous ces paramètres, nous pouvons assurer une reconstruction plus précise. Comme dans le cas 2D, nous commençons par définir la fonction de coût  $\mathcal{C}$  en fonction de la distance euclidienne entre les projections réelles  $\mathbf{\Pi}$  et les projections de l'objet reconstruit  $\mathbf{P}$ .

$$\mathcal{C}(\mathbf{f}, \alpha, \beta, \gamma, \mathbf{t}_x, \mathbf{t}_y, \mathbf{t}_z) = \frac{1}{2} \|\mathbf{\Pi} - \mathbf{P}\|_2^2 \quad (3.10)$$

$$= \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \|\boldsymbol{\pi}^i - \mathbf{p}^i\|_2^2 \quad (3.11)$$

Cette équation peut être développée comme :

$$\mathcal{C}(\mathbf{f}, \dots, \mathbf{t}_z) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\mathbf{S}} \sum_{j=1}^{\mathbf{M}} (\pi_j^i - p_j^i)^2 \quad (3.12)$$

où

$$p_j^i = \sum_{k=1}^N w_{jk}(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) f_k^i \quad (3.13)$$

$$= \sum_{k=1}^N w_{jk}(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) \left( \sum_{l=1}^N t_{kl}(tx_i, ty_i, tz_i) f_l \right) \quad (3.14)$$

Le but de notre optimisation est de minimiser cette fonction pour avoir un objet reconstruit plus correct.

$$(\hat{\mathbf{f}}, \hat{\boldsymbol{\alpha}}, \hat{\boldsymbol{\beta}}, \hat{\boldsymbol{\gamma}}, \hat{\mathbf{t}\mathbf{x}}, \hat{\mathbf{t}\mathbf{y}}, \hat{\mathbf{t}\mathbf{z}}) = \operatorname{argmin} \mathcal{C}(\mathbf{f}, \dots, \mathbf{t}\mathbf{z}) \quad (3.15)$$

Afin d'utiliser l'optimisation via le GC comme dans le cas 2D, il faut calculer le gradient de la fonction de coût  $\mathcal{C}$ . Pour faciliter cette phase, nous avons modifié l'équation (3.12) :

$$\mathcal{C}(\mathbf{f}, \dots) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^S \sum_{j=1}^M (\mathcal{C}r(\mathbf{f}, \alpha_i, \beta_i, \gamma_i, tx_i, ty_i, tz_i, j))^2 \quad (3.16)$$

avec  $\mathcal{C}r(\mathbf{f}, \dots, j) = \pi_j^i - \sum_{k=1}^N w_{jk}(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) f_k^i$ .

Maintenant, nous calculons le gradient de  $\mathcal{C}r$ , ensuite, nous déduisons le gradient de  $\mathcal{C}$ .

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial f_h} \approx - \sum_{i=1}^S \sum_{j=1}^M \mathcal{C}r(\dots) \sum_{k=1}^N w_{jk}(\alpha_i, \dots) t_{kh}(tx_i, \dots) \quad (3.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial \mathcal{C}}{\partial \alpha_h} \approx \frac{1}{2\Delta_\alpha} \sum_{j=1}^M \mathcal{C}r(\mathbf{f}, \alpha_h, \dots) & \left( \sum_{k=1}^N \right. \\ & \left. (w_{jk}(\alpha_h - \Delta_\alpha, \beta_h, \gamma_h) - w_{jk}(\alpha_h + \Delta_\alpha, \beta_h, \gamma_h)) f_k^i \right) \end{aligned} \quad (3.18)$$

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial \beta_h} \approx \frac{1}{2\Delta_\beta} \sum_{j=1}^M \mathcal{C}r(\mathbf{f}, \alpha_h, \dots) \left( \sum_{k=1}^N (w_{jk}(\alpha_h, \beta_h - \Delta_\beta, \gamma_h) - w_{jk}(\alpha_h, \beta_h + \Delta_\beta, \gamma_h)) f_k^i \right) \quad (3.19)$$

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial \gamma_h} \approx \frac{1}{2\Delta_\gamma} \sum_{j=1}^M \mathcal{C}r(\mathbf{f}, \alpha_h, \dots) \left( \sum_{k=1}^N (w_{jk}(\alpha_h, \beta_h, \gamma_h - \Delta_\gamma) - w_{jk}(\alpha_h, \beta_h, \gamma_h + \Delta_\gamma)) f_k^i \right) \quad (3.20)$$

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial t_{x_h}} \approx \frac{1}{2\Delta_{t_x}} \sum_{j=1}^M \mathcal{C}r(\mathbf{f}, \alpha_h, \dots) \left( \sum_{k=1}^N w_{jk}(\alpha_h, \beta_h, \gamma_h) \sum_{l=1}^N (t_{kl}(t_{x_h} - \Delta_{t_x}, t_{y_h}, t_{z_h}) - t_{kl}(t_{x_h} + \Delta_{t_x}, t_{y_h}, t_{z_h})) f_l^i \right) \quad (3.21)$$

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial t_{y_h}} \approx \frac{1}{2\Delta_{t_y}} \sum_{j=1}^M \mathcal{C}r(\mathbf{f}, \alpha_h, \dots) \left( \sum_{k=1}^N w_{jk}(\alpha_h, \beta_h, \gamma_h) \sum_{l=1}^N (t_{kl}(t_{x_h}, t_{y_h} - \Delta_{t_y}, t_{z_h}) - t_{kl}(t_{x_h}, t_{y_h} + \Delta_{t_y}, t_{z_h})) f_l^i \right) \quad (3.22)$$

$$\frac{\partial \mathcal{C}}{\partial t_{z_h}} \approx \frac{1}{2\Delta_{t_z}} \sum_{j=1}^M \mathcal{C}r(\mathbf{f}, \alpha_h, \dots) \left( \sum_{k=1}^N w_{jk}(\alpha_h, \beta_h, \gamma_h) \sum_{l=1}^N (t_{kl}(t_{x_h}, t_{y_h}, t_{z_h} - \Delta_{t_z}) - t_{kl}(t_{x_h}, t_{y_h}, t_{z_h} + \Delta_{t_z})) f_l^i \right) \quad (3.23)$$

Lancer notre approche en utilisant directement les images de projection directement est une opération coûteuse en terme de temps de calcul (*e.g.* le traitement

d'un objet de taille  $32^3$  peut prendre plus de 8 heures de calcul). Pour cette raison, nous avons eu l'idée d'appliquer l'algorithme sur des images d'échelle plus petite. Cependant, l'utilisation d'une échelle réduite affecte la précision de l'optimisation, d'où la pertinence de l'aspect multi-échelle dans ce processus.

### 3.2.3 Accélération de l'optimisation via la méthode multi-échelle

Une des méthodes les plus répandues dans la littérature est celle proposée en 1989 par S. Mallat [Mal89] qui a permis d'ouvrir un champ d'exploitation de la transformée en ondelettes dans diverses applications en traitement d'images. Cette méthode combine l'analyse multi-échelle et la transformée en ondelettes pour avoir une représentation d'une fonction non redondante et sans perte.

L'analyse multi-échelle introduite dans [Mal89] a pour objectif d'approcher une fonction à une résolution de l'ordre 2 (*i.e.* diviser l'échelle à chaque fois par 2). Le passage d'une échelle à une autre donne une représentation de plus en plus grossière de la fonction initiale ainsi que de son détail. Cette décomposition permet de récupérer les détails d'une fonction et d'avoir, ainsi, une transformée réversible.

Soit  $S_0$  l'échelle réelle de l'image, si nous appliquons la transformée en ondelettes  $n$  fois sur les images de projections, nous arrivons à l'échelle  $S_n$ . Nous utilisons les ondelettes de Meyer [Mey90] pour mettre en place un processus hiérarchique multi-échelle. Les ondelettes sont des fonctions qui respectent certains critères d'orthogonalité nécessaires pour la construction d'une analyse multi-échelle. En particulier, l'ondelette de Meyer est une ondelette orthogonale avec une fonction d'échelle sans aucun filtrage, ce qui permet d'éviter une perte d'information importante de l'image [Mey90], et c'est un avantage très important dans notre cas.

Nous commençons le processus à l'échelle  $S_n$ . En utilisant les images de projection à l'échelle réduite  $S_n$  et les angles d'inclinaison, une reconstruction préliminaire est appliquée. Au début, nous supposons que les angles d'inclinaison ne sont pas erronés et qu'aucune erreur en rotation ou en translation n'existe. Après avoir

trouvé les paramètres optimaux de la transformation géométrique, le processus est réitéré en utilisant l'échelle  $S_{n-1}$  avec les paramètres récupérés de l'estimation initiale, où nous utilisons les mêmes paramètres de rotation mais les paramètres de translation sont adaptées en fonction de la nouvelle échelle.

Nous répétons itérativement le processus jusqu'à ce que nous atteignons l'échelle  $S_0$ . L'échelle réelle ne sera pas utilisée jusqu'à ce que les paramètres de transformation soient optimaux.

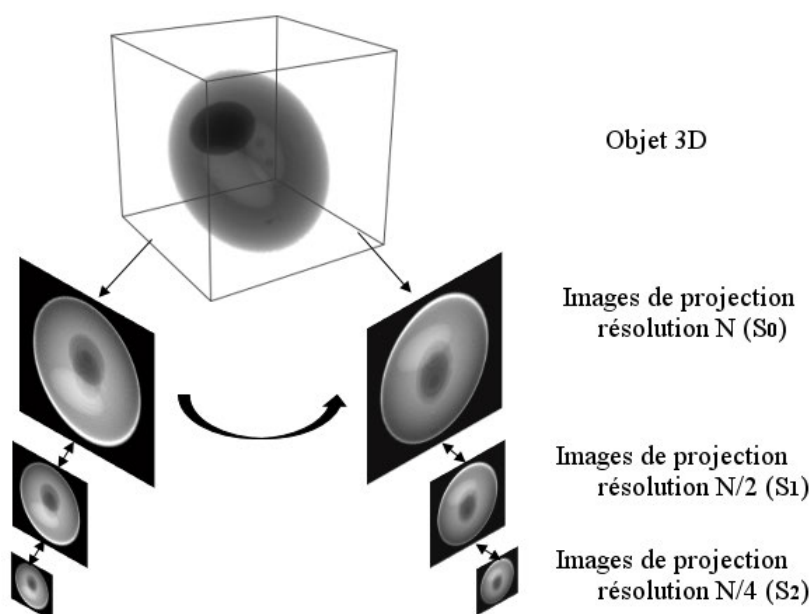


FIGURE 3.3 — Correction des paramètres de la transformation géométrique et amélioration du modèle 3D reconstruit par l'aspect multi-échelle pyramidal.

### 3.2.4 Algorithme d'alignement et reconstruction 3D multi-échelle

Tout d'abord, nous faisons une reconstruction initiale, *i.e.* initiale avec la méthode de reconstruction algébrique SIRT. SIRT a été choisi pour sa qualité de reconstruction supérieure à celle trouvée avec les autres méthodes de reconstruction [Her09]. Deuxièmement, nous prenons l'objet reconstruit initial et les données



de projection avec les orientations utilisées dans l'acquisition et des paramètres de translation nuls comme entrées pour l'algorithme GC itératif. La sortie du procédé décrit est un objet reconstruit plus précis et une amélioration des orientations. L'algorithme de notre approche est présenté par Algorithme 3 [RBN<sup>+</sup>16b].

---

**Algorithme 3** : Alignement et reconstruction 3D multi-échelle conjointe
 

---

**Données** :  $\mathbf{f}^{init}$ ,  $\boldsymbol{\alpha}^{init}$ ,  $\boldsymbol{\beta}^{init}$ ,  $\boldsymbol{\gamma}^{init}$ ,  $\boldsymbol{\Pi}$

initialisation  $\boldsymbol{\alpha}_0 = \boldsymbol{\alpha}^{init}$ ,  $\boldsymbol{\beta}_0 = \boldsymbol{\beta}^{init}$ ,  $\boldsymbol{\gamma}_0 = \boldsymbol{\gamma}^{init}$ ,  $\mathbf{tx}_0 = 0$ ,  $\mathbf{ty}_0 = 0$ ,  $\mathbf{tz}_0 = 0$ ,  
 $\Delta\mathcal{C} \leftarrow +\infty$ ,  $iter = 0$ ,  $n$

**tant que**  $n \geq 0$  **faire**

$\boldsymbol{\Pi}^n \leftarrow$  Réduit\_échelle\_projection ( $\boldsymbol{\Pi}$ ,  $n$ )

$\mathbf{f} \leftarrow$  reconstruction( $\boldsymbol{\Pi}^n$ ,  $\boldsymbol{\alpha}$ ,  $\boldsymbol{\beta}$ ,  $\boldsymbol{\gamma}$ )

**tant que**  $iter < iter_{max}$  **ET**  $\Delta\mathcal{C} \leftarrow \leq \varepsilon$  **faire**

        Calculer le gradient  $\nabla\mathcal{C}(\mathbf{f}_{iter}, (\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma})_{iter}, (\mathbf{tx}, \mathbf{ty}, \mathbf{tz})_{iter})$

        Applique CG( $\mathbf{f}_{iter+1}, (\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma})_{iter+1}, (\mathbf{tx}, \mathbf{ty}, \mathbf{tz})_{iter+1}$ )

$\Delta\mathcal{C} = \mathcal{C}(\mathbf{f}_{iter}, (\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma})_{iter}, (\mathbf{Tx}, \mathbf{Ty}, \mathbf{Tz})_{iter}) -$

$\mathcal{C}(\mathbf{f}_{iter+1}, (\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma})_{iter+1}, (\mathbf{Tx}, \mathbf{Ty}, \mathbf{Tz})_{iter+1})$

$\mathbf{f}_{iter} \leftarrow \mathbf{f}_{iter+1}, (\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma})_{iter} \leftarrow (\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma})_{iter+1}$

$(\mathbf{tx}, \mathbf{ty}, \mathbf{tz})_{iter} \leftarrow (\mathbf{tx}, \mathbf{ty}, \mathbf{tz})_{iter+1}, iter \leftarrow iter + 1$

$n \leftarrow n - 1$ ,  $iter \leftarrow 0$ ,  $\Delta\mathcal{C} \leftarrow +\infty$

    Changer\_échelle\_translation ( $\mathbf{tx}, \mathbf{ty}, \mathbf{tz}, n$ )

**Résultats** :  $\mathbf{f}_{iter+1}, (\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\gamma})_{iter+1}, (\mathbf{tx}, \mathbf{ty}, \mathbf{tz})_{iter+1}$

---

Dans notre cas, l'algorithme commence par une estimation proche de l'objet, et par hypothèse, les angles d'inclinaison et les transformations géométriques sont aussi proches des valeurs réelles. Donc, notre espace de recherche est une hypersphère dont le rayon est la valeur de la fonction de coût donnée par la première itération de notre algorithme. Du point de vue de la régularisation, le volume estimé à chaque itération est une solution régularisée et le nombre d'itérations joue le rôle du paramètre de régularisation [WSS13]. Le principe de base de la régularisation est de lisser la solution par l'amortissement des valeurs de voxels négatives calculées par GC et en veillant à ce que la valeur de la fonction ne dépasse pas le

rayon de l'hypersphère de recherche.

Les performances de nos algorithmes sont présentées dans la prochaine section.

## 3.3 Évaluation

### 3.3.1 Mesures d'évaluation

Pour mesurer la qualité de la reconstruction, nous proposons deux critères. Le premier est le coefficient de corrélation croisée (l'équation (3.24)). C'est un critère pour mesurer le taux de similarité entre l'image originale et l'image reconstruite. Ce coefficient est égal à 1 lorsque l'image reconstruite coïncide exactement avec l'image originale et égale à zéro dans le cas le plus défavorable. Le deuxième critère est l'erreur quadratique moyenne normalisée (EQMN) définie par l'équation (3.25). Contrairement au coefficient de corrélation, le zéro dans l'EQMN signifie un meilleur résultat. Nous utilisons l'EQMN pour mesurer la correction des orientations réalisée par notre approche. L'équation (3.26) présente la mesure de correction d'orientation ( $MCO$ ). Plus la valeur de  $MCO$  est proche de zéro, plus les orientations trouvées par notre approche sont correctes.

$$corr = \frac{\sum_{k=1}^N (f_k - M(\mathbf{f}))(\hat{f}_k - M(\hat{\mathbf{f}}))}{\sqrt{\sum_{k=1}^N (f_k - M(\mathbf{f}))^2 \sum_{k=1}^N (\hat{f}_k - M(\hat{\mathbf{f}}))^2}} \quad (3.24)$$

avec  $M(\mathbf{f})$  et  $M(\hat{\mathbf{f}})$  sont respectivement les moyennes de  $\mathbf{f}$  et  $\hat{\mathbf{f}}$ .

$$EQMN = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^S (\theta_i - \hat{\theta}_i)^2}{S}}}{\max(\Theta) - \min(\Theta)} \quad (3.25)$$

$$MCO = \frac{EQMN_{final}}{EQMN_{init}} \quad (3.26)$$

avec  $EQMN_{init}$  et  $EQMN_{final}$  sont respectivement l'EQMN entre les orientations correctes, les orientations avant l'optimisation et les orientations après l'optimisation. Donc, si les orientations après l'optimisation sont totalement correctes,

$EQMN_{final}$  égale à 0, ce qui signifie que  $MCO$  est nul aussi. Cependant, si les erreurs d'orientation ne sont pas corrigées ou sont même amplifiées, le  $MCO$  sera plus grand que 1.

En outre, nous présentons une nouvelle métrique VAR pour évaluer le changement de la qualité et de la résolution native de l'objet dans le processus de reconstruction par rapport à la résolution initiale de l'objet. La métrique proposée est utilisée pour montrer la relation entre les erreurs des angles d'inclinaison utilisés dans la projection et la dégradation de la résolution en prenant en compte non seulement l'aspect statistique comme celui donné par  $corr$  et  $MCO$ , mais l'aspect visuel de la reconstruction aussi. Cette métrique est utilisée dans les tests synthétiques 2D. Plus de détails de cette métrique appelée l'assomption visuelle de la résolution (*i.e.* **V**isual **A**ssumption of **R**esolution (VAR)) sont présentés dans la section suivante.

### 3.3.1.1 Assomption visuelle de la résolution

La résolution est une propriété importante lors de la reconstruction d'un objet, elle affecte la qualité visuelle de l'objet et elle joue un rôle significatif dans la détermination de la performance de la segmentation. Une meilleure résolution signifie une meilleure segmentation. Comment pouvons-nous définir la résolution et juger sa qualité ?

L'estimation de résolution tomographique vise à connaître le niveau de détail fiable présent dans le tomogramme. Une approche couramment utilisée dans la microscopie électronique par particules isolées (MEPI) est Fourier Shell Correlation (FSC) [HvH86], qui est une généralisation 3D de l'approche 2D Fourier Ring Correlation (FRC) [SB82]. Dans cette approche, la série de projection est découpée en deux moitiés (contenant respectivement les images de projection paires et impaires). À partir de ces deux demi-séries, deux tomogrammes sont calculés, et sont ensuite comparés dans l'espace de Fourier pour trouver la résolution spatiale maximale jusqu'à laquelle les deux tomogrammes sont mutuellement cohérents. Cependant, de nombreux critères influent sur la fiabilité de cette approche tel

que le seuil utilisé, le nombre de voxels du tomogramme, la symétrie de données et d'autres critères qui sont discutés avec plus de détails dans [vHS05]. En plus, FSC est bien développée pour le cas de la MEPI, mais le manque de données dans l'espace de Fourier et le fait que pour chaque direction il existe une seule projection rend cette approche peu adaptée pour le cas de la tomographie électronique [Pen10]. Il y a quelques approches qui ont proposé d'adapter la FSC à la tomographie électronique [Pen02] [UST<sup>+</sup>05]. Cependant, ces techniques exigent un bon suréchantillonnage dans l'espace de Fourier pour obtenir un résultat correct [Pen10].

Une autre approche intéressante, notée *Noise-compensated Leave One Out* (NLOO) [CGS05], a été proposée pour résoudre ce problème. Dans cette approche, un tomogramme est calculé à partir de toute la série de projections, sauf une seule image de projection. Ensuite, une projection est calculée à partir du tomogramme trouvé à la direction de la projection manquante, et une comparaison est réalisée dans l'espace de Fourier par FRC entre la projection calculée et la projection manquante de la série [CGS05]. Cette méthode est répétée pour chaque image de la série de projection. Si le pas entre les projections est petit ( $1^\circ$ ), FSC et NLOO donnent des résultats similaires, sinon NLOO est plus fiable. Cependant, le temps de calcul de NLOO est important.

Une autre signification populaire du terme « résolution » est le nombre de pixels d'une image ou ses dimensions. Ici, par résolution, nous entendons la capacité de dire si un ensemble de pixels représente des objets distincts plutôt qu'un seul objet (*cf.* les rectangles rouges dans la figure 3.4 présentent un de ces cas où nous voyons dans la résolution  $64 \times 64$  le rectangle rouge contenant un seul objet, mais en réalité cette partie contient 3 objets distincts montrés par la résolution  $256 \times 256$ ). Dans la microscopie électronique, notre domaine d'intérêt, la résolution (ou la résolution spatiale) fait référence à la distance minimale entre deux objets adjacents distingués dans l'image [OA04]. Afin d'examiner l'effet de l'erreur angulaire sur la résolution de l'objet reconstruit, les auteurs de [MW03] ont proposé une approche pour examiner l'effet de l'erreur angulaire sur la résolution de l'objet reconstruit. La résolution dans cette approche est calculée sur les trois plans  $XY$ ,  $XZ$ ,  $ZY$ .

Pour le premier plan, la résolution est égale à celle des images de projections. Pour le deuxième plan, la résolution est égale à  $\pi L_d/n_\theta$ , où  $L_d$  est la longueur de côté maximal de l'objet reconstruit et  $n_\theta$  présente le nombre d'angles d'inclinaison. La résolution du dernier plan est la dégradation de celle de plan  $XZ$  par un facteur  $e_{yz} = \sqrt{\frac{\theta_{\max} + \sin \theta_{\max} \cos \theta_{\max}}{\theta_{\max} - \sin \theta_{\max} \cos \theta_{\max}}}$ , où  $\theta_{\max}$  l'angle maximal d'inclinaison.

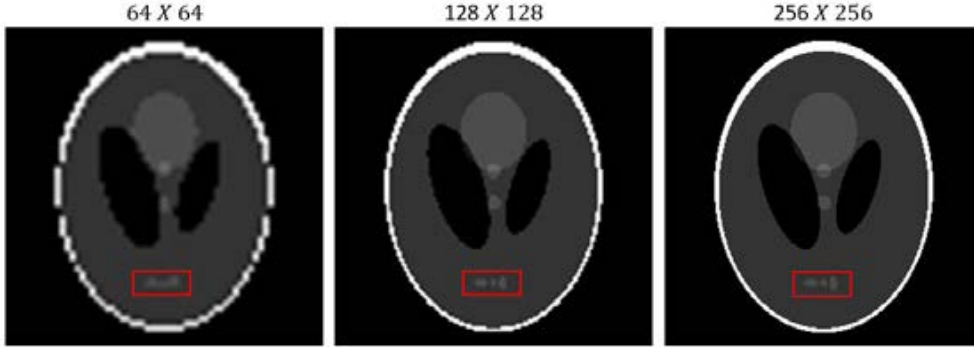
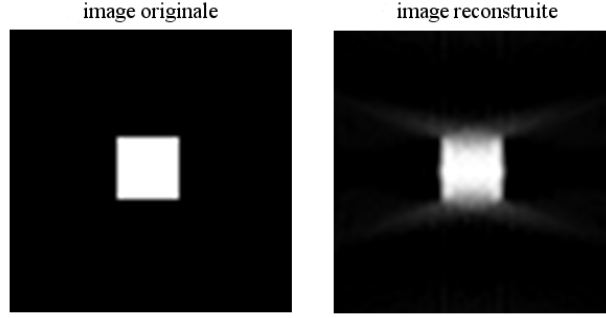


FIGURE 3.4 — Effet de la résolution de pixel.

Nous proposons une autre façon de déterminer la résolution spatiale, basée sur une simulation de l'expérience visuelle avec l'image. Notre objectif n'est pas de calculer la résolution réelle de l'objet 3D, mais d'analyser l'effet de notre approche d'optimisation sur la résolution pixelique, la diminution ou l'augmentation du nombre de pixels contenant des informations dans l'image reconstruite, qui est endommagé par les problèmes de la tomographie électronique.

Si nous analysons visuellement l'objet reconstruit, nous constatons que la qualité de la reconstruction des formes dans l'image dépend du nombre d'itérations de l'algorithme de reconstruction et du nombre de projections utilisés dans cette reconstruction (*cf.* figure 3.5). L'effet du manque de projections et du faible nombre d'itérations se traduit par une perturbation sur les frontières des objets de l'image, ce qui conduit à la fusion des objets s'ils sont proches. L'analyse du rendu de la reconstruction révèle un changement dans l'intensité de l'objet. Ces constatations nous ont guidé à utiliser ces deux aspects pour calculer les pertes de la résolution de l'objet réel après reconstruction.



**FIGURE 3.5** — Réduction de la résolution après la reconstruction avec SIRT (100 itération) et  $n_\theta = 71$ .

La métrique VAR que nous avons introduite pour l'évaluation de la reconstruction intervient avec deux alternatives : la première permet d'interpréter la similarité d'espace entre l'image originale et l'image reconstruite (noté par  $\text{VAR}_{\text{espace}}$ ), la seconde permet d'étudier la variation spectrale (l'intensité de gris) (noté par  $\text{VAR}_{\text{spectrale}}$ ) [RBN<sup>+</sup>16c].

Pour calculer  $\text{VAR}_{\text{espace}}$ , nous allons compter le nombre des pixels non nuls dans l'image de différence entre l'image originale et l'image reconstruite après un simple seuillage de deux images. La valeur trouvée sera normalisée par le nombre de pixels non nuls dans l'image originale. L'équation pour calculer  $\text{VAR}_{\text{espace}}$  comme suit :

$$\text{VAR}_{\text{espace}} = \frac{\sum_{i=1}^{\mathbf{N}} |R_i - O_i|}{\sum_{i=1}^{\mathbf{N}} O_i} \quad (3.27)$$

Où  $\mathbf{N}$  est le nombre total de pixels dans l'image.

- $R_i = 1$  (respectivement  $O_i = 1$ ) si la  $i^{\text{e}}$  pixel de l'image reconstruite (respectivement d'origine) est non nul,
- $R_i = 0$  (respectivement  $O_i = 0$ ) sinon.

$\text{VAR}_{\text{espace}}$  est alors nulle si les pixels non nuls dans les deux images ont les mêmes coordonnées, sinon elle sera supérieure à zéro.

Pour calculer  $\text{VAR}_{\text{spectrale}}$ , nous nous intéressons à la somme des intensités de tous les pixels dans l'image de différence entre l'image originale et l'image reconstruite. De même que l'équation (3.27), la différence est normalisée par la

somme des intensités de l'image originale. L'équation pour le calcul de  $VAR_{spectrale}$  est la suivante :

$$VAR_{spectrale} = \frac{\sum_{i=1}^N |PxR_i - PxO_i|}{\sum_{i=1}^N PxO_i} \quad (3.28)$$

où  $PxR_i$  (respectivement  $PxO_i$ ) est l'intensité spectrale du  $i^e$  pixel de l'image de reconstruction (respectivement d'origine).  $VAR_{spectrale}$  est nulle elle est nulle si les deux images qu'elle a évaluées ont la quantité de radiométries identique, sinon elle est supérieure à zéro.

La valeur de VAR retenue est la moyenne entre  $VAR_{espace}$  et  $VAR_{spectrale}$ .

$$VAR = \frac{VAR_{space} + VAR_{spectral}}{2} \quad (3.29)$$

Les valeurs de VAR, ainsi que les autres évaluations sont présentées dans la section suivante.

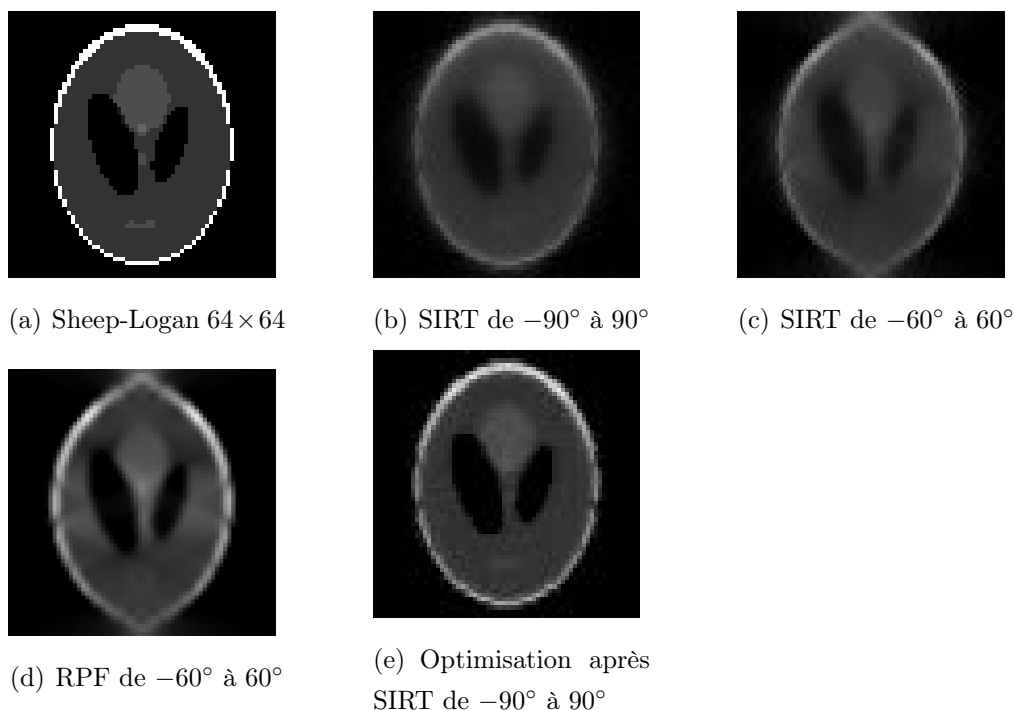
### 3.3.2 Cas 2D

Plusieurs tests ont été effectués pour valider notre approche.

Tout d'abord, nous présentons une image de test et la correction de ses erreurs d'orientations. Dans la figure 3.6, nous représentons l'image sur laquelle les tests ont été réalisés qui est le fantôme de Shepp-Logan de résolution  $64 \times 64$ . Les reconstructions sont initiées avec des orientations perturbées par un bruit gaussien de variance 1,5, sur deux intervalles d'orientation différents ( $[-90^\circ 90^\circ]$  et  $[-60^\circ 60^\circ]$ ) avec un pas de 2.

Les deux reconstructions ont pour but de montrer l'effet de la zone manquante de la projection dans la tomographie électronique. Nous constatons, dans la figure 3.7, la puissance de notre approche pour la correction d'erreurs angulaires. Lors de l'analyse de la figure, nous trouvons que le flou devient plus faible après l'utilisation de notre approche. De plus, en examinant la partie (d) de la figure, nous trouvons que les bords des objets sont plus clairs et plus détaillés. Ainsi, nous pouvons visualiser les petits objets dans l'image qui ne sont pas reconstruits par simple

reconstruction.



**FIGURE 3.6** — Les résultats de reconstruction et d’optimisation sur une image fantôme du Sheep-Logan avec des erreurs d’orientations de variance de 1,5.

Notre approche a été évaluée par rapport aux méthodes de reconstruction analytique et algébrique en utilisant la métrique VAR. Ceci nous a permis d’étudier l’effet de l’incertitude angulaire sur la reconstruction. Notre méthode a été appliquée sur 60 images de niveau de gris simple (8 niveau de gris) et de différentes tailles, avec différents degrés d’erreur angulaire ( $EA$ ) appliqué sur les deux ensembles d’angles d’acquisition.

En analysant les deux tableaux tab.3.1 et tab.3.2 qui contiennent les moyennes des résultats de tests, nous constatons que la méthode algébrique SIRT conserve mieux la résolution de l’image que la méthode analytique RPF. Ceci justifie notre choix d’adopter la structure algébrique dans notre démarche.

L’interprétation des résultats révèle que notre approche conserve mieux la résolution de l’objet reconstruit. Même avec des angles d’acquisition erronés, notre



**TABLE 3.1** — Les résultats par VAR pour les données synthétiques 2D avec  $n_\theta = 360$ .

Méthodes \ $EA$	$0^\circ$	$\leq 1^\circ$	$\leq 2^\circ$
RPF	0,53	0,79	0,93
SIRT	0,13	0,21	0,32
Notre approche	0,09	0,13	0,15

**TABLE 3.2** — Les résultats par VAR pour les données synthétiques 2D avec  $n_\theta = 71$ .

Méthodes \ $EA$	$0^\circ$	$\leq 1^\circ$	$\leq 2^\circ$
RPF	0,81	0,95	1,23
SIRT	0,26	0,38	0,57
Notre approche	0,17	0,26	0,28

approche fournit un résultat très proche de celui de l'algorithme SIRT opérant avec des angles totalement corrects.

Pour plus de tests, nous avons utilisé une base de 50 images avec différents niveaux du gris et différentes tailles ( $32 \times 32$ ,  $64 \times 64$ ,  $128 \times 128$ ,  $256 \times 256$ ). Quelques images de la base sont présentées dans la figure 3.8.

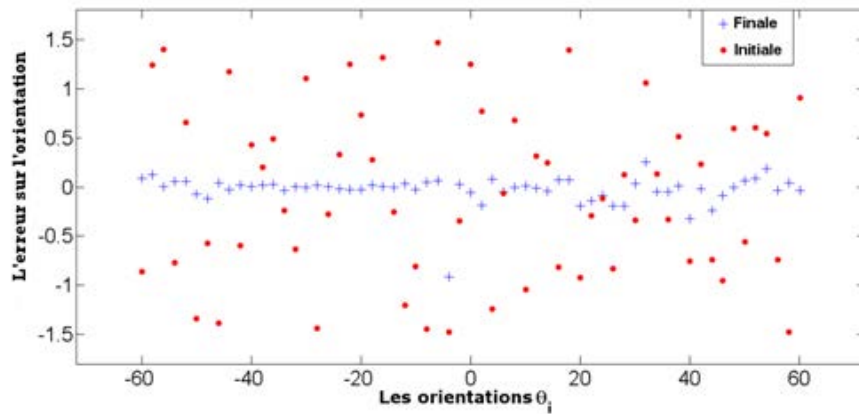


FIGURE 3.7 — L'amélioration d'erreur entre les orientations initiales et celles corrigées pour la figure 3.6(c).

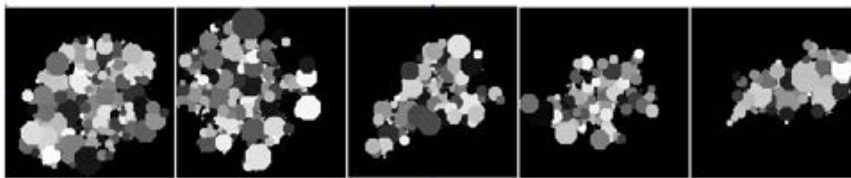


FIGURE 3.8 — Les images testées.

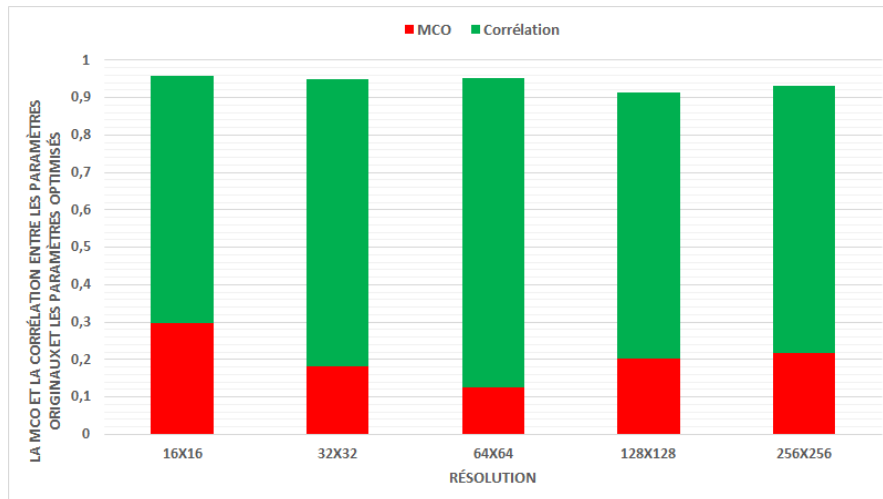


FIGURE 3.9 — la MCO et la corrélation moyennes (cas 2D).

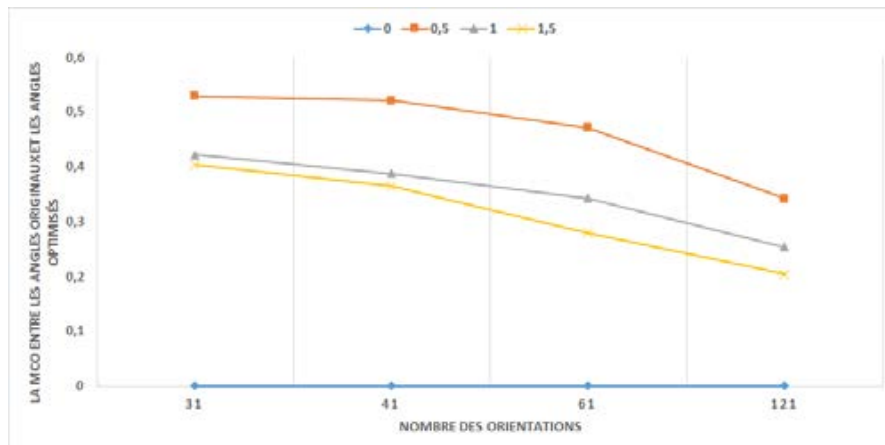


FIGURE 3.10 — La correction des orientations suivant différentes variances d’erreurs, pour différents nombres d’orientations (cas 2D).

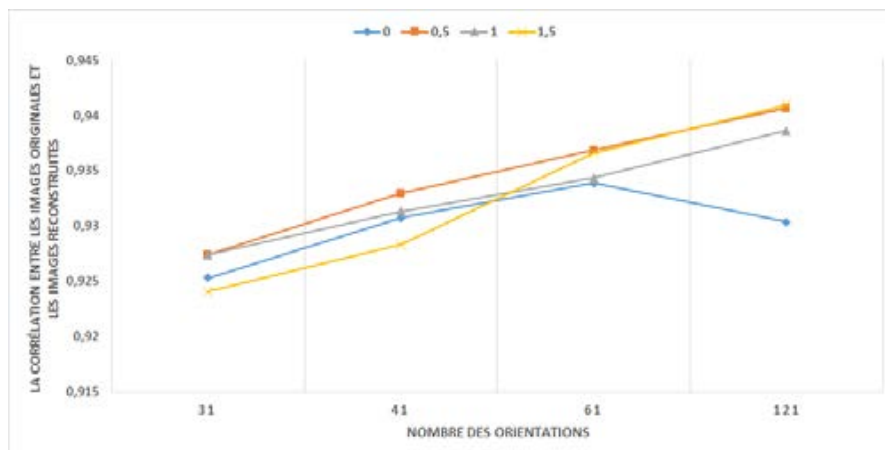


FIGURE 3.11 — La correction des images suivant différentes variances d’erreurs, pour différents nombres d’orientations (cas 2D).

Les tests sont faits avec des orientations erronées par un bruit gaussien de quatre variances différentes 0, 0,5, 1, 1,5. Les inclinaisons sont générées de  $-60^\circ$  à  $60^\circ$  avec quatre incréments 4, 3, 2, 1 produisant des nombres de projections respectivement 31, 41, 61, 121.

La figure 3.9 présente la moyenne de ces tests pour chaque résolution. La figure 3.9 représente les mesures de la *MCO* et la corrélation entre les images et

les orientations vraies d'un côté et les images reconstruites et les orientations optimisées de l'autre, pour les différents niveaux de résolution. En ce qui concerne la corrélation, on remarque qu'elle est, en général, très proche de 1, même si elle diminue légèrement pour les grandes résolutions.

En ce qui concerne la *MCO*, on constate que pour des résolutions faibles ou de hautes résolutions, celle-ci est assez grande. Ceci s'explique par le fait que la correction des orientations est influencée par la résolution. En effet, une faible résolution rend la correction des erreurs angulaires difficile comme il existe moins de détails dans l'image. D'un autre côté, une haute résolution donne plus de détails qui augmentent l'espace de recherche pour l'optimisation, ceci requiert plus d'itérations que le nombre choisi dans ces tests afin de corriger les erreurs. Dans le cas où la résolution serait moyenne, le résultat de *MCO* est satisfaisant.

La figure 3.10 présente la *MCO* moyenne de toutes les images de test pour chaque ensemble d'orientations avec les différents niveaux d'erreur utilisés. De même pour la corrélation présentée dans la figure 3.11.

Nous constatons que le *MCO* diminue lorsque le nombre d'orientations utilisé est plus grand, ce qui est logique, car nous avons plus d'informations à traiter dans la fonction de coût ce qui améliore la correction de l'orientation. De même pour la corrélation, elle s'améliore avec le nombre d'orientations utilisées.

### 3.3.3 Cas 3D par coupes

Nous passons maintenant au cas 3D par coupes. Les mêmes protocoles de tests que le cas 2D sont réalisés avec 80 images 3D en niveaux de gris et de tailles ( $16 \times 16 \times 16$ ,  $32 \times 32 \times 32$ ,  $64 \times 64 \times 64$ ,  $128 \times 128 \times 128$ ). Quelques images de la base sont présentées dans la figure 3.12.

Nous pouvons observer dans la figure 3.13 que la corrélation est forte pour les différentes résolutions des images 3D utilisées. De même la corrélation s'améliore avec la résolution de l'image comme l'indique la figure 3.15. Néanmoins, la *MCO* correspondante est assez grande (proche de 0,42 pour une résolution de  $128 \times 128 \times$

128).



FIGURE 3.12 — Les images 3D de test.

Par ailleurs, nous pouvons remarquer en nous basant sur la figure 3.14 que la correction de l'erreur des orientations avec une variance de 0,5 n'est pas aussi fiable que les autres corrections enregistrées pour les trois valeurs de variances utilisées. Ceci est étroitement lié au choix de la valeur de  $\Delta_\theta$  utilisée dans le calcul du gradient dans ces tests.

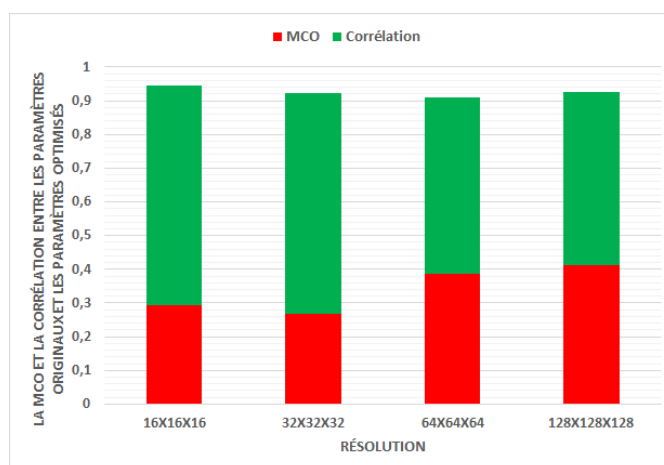


FIGURE 3.13 — La MCO moyenne et la corrélation moyenne (cas 3D par coupes).

Nous avons testé aussi notre approche sur des jeux de données réels. Les images de projection sont celles du virus Orf parapoxvirus (70 projections de taille  $400 \times 400$ , figure 3.16) acquises entre les angles  $-60^\circ$  et  $60^\circ$  avec un pas de  $1^\circ$  dans les intervalles  $[-60^\circ -50^\circ]$  et  $[50^\circ 60^\circ]$ , et un pas de  $2^\circ$  dans le reste. Ces projections sont alignées par une simple méthode de corrélation deux à deux. Nous avons aussi une reconstruction faite par des experts à partir du même jeu de données. Cette

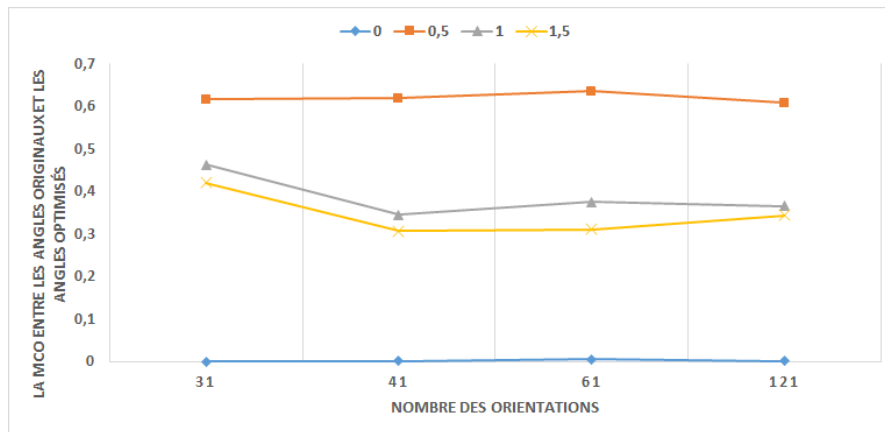


FIGURE 3.14 — La correction des orientations suivant différentes variances d’erreurs, pour différents nombres d’orientations (cas 3D par coupes).

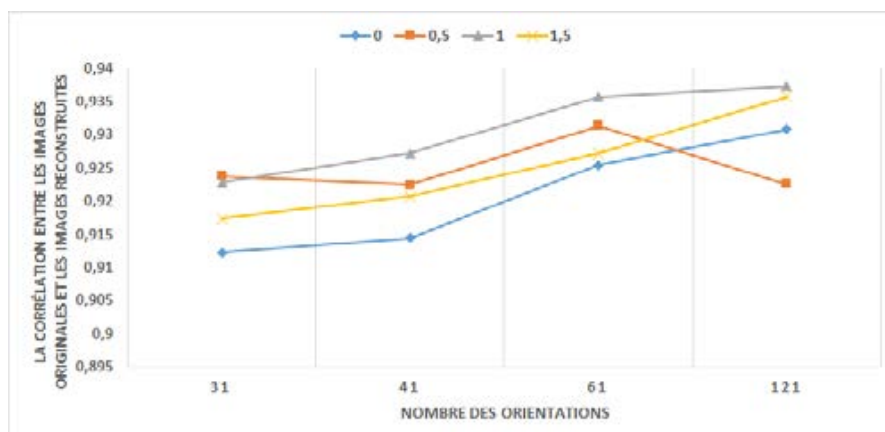
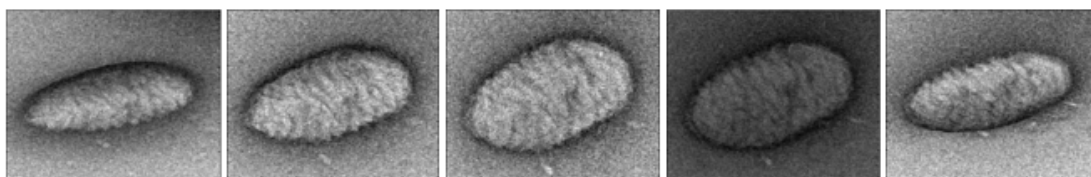


FIGURE 3.15 — La correction des images suivant différentes variances d’erreurs, pour différents nombres d’orientations (cas 3D par coupes).

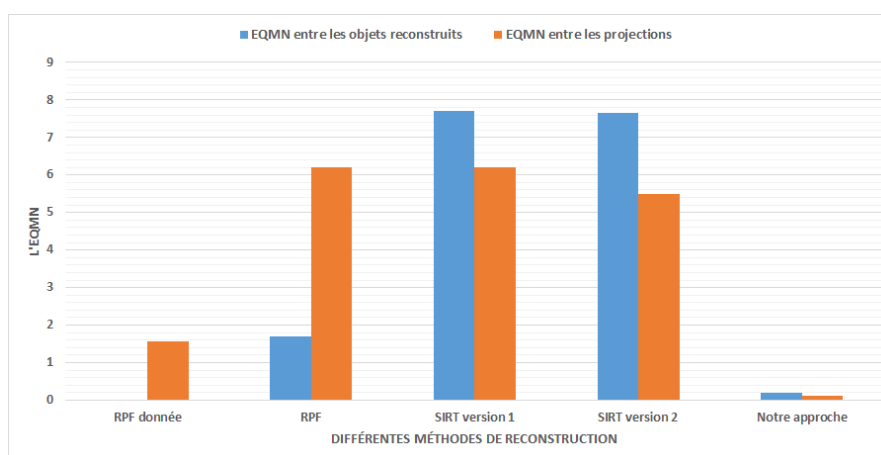
reconstruction (que nous notons par RPF donnée) est réalisée par la méthode RPF avec des traitements de corrections manuelles pour améliorer sa qualité. Nous allons utiliser cet objet reconstruit ainsi que les projections réelles comme des modèles de comparaison pour évaluer nos résultats.



**FIGURE 3.16** — Les projections de orf parapoxvirus respectivement suivant les angles  $-60^\circ$ ,  $-40^\circ$ ,  $-10^\circ$ ,  $20^\circ$ , et  $50^\circ$ .

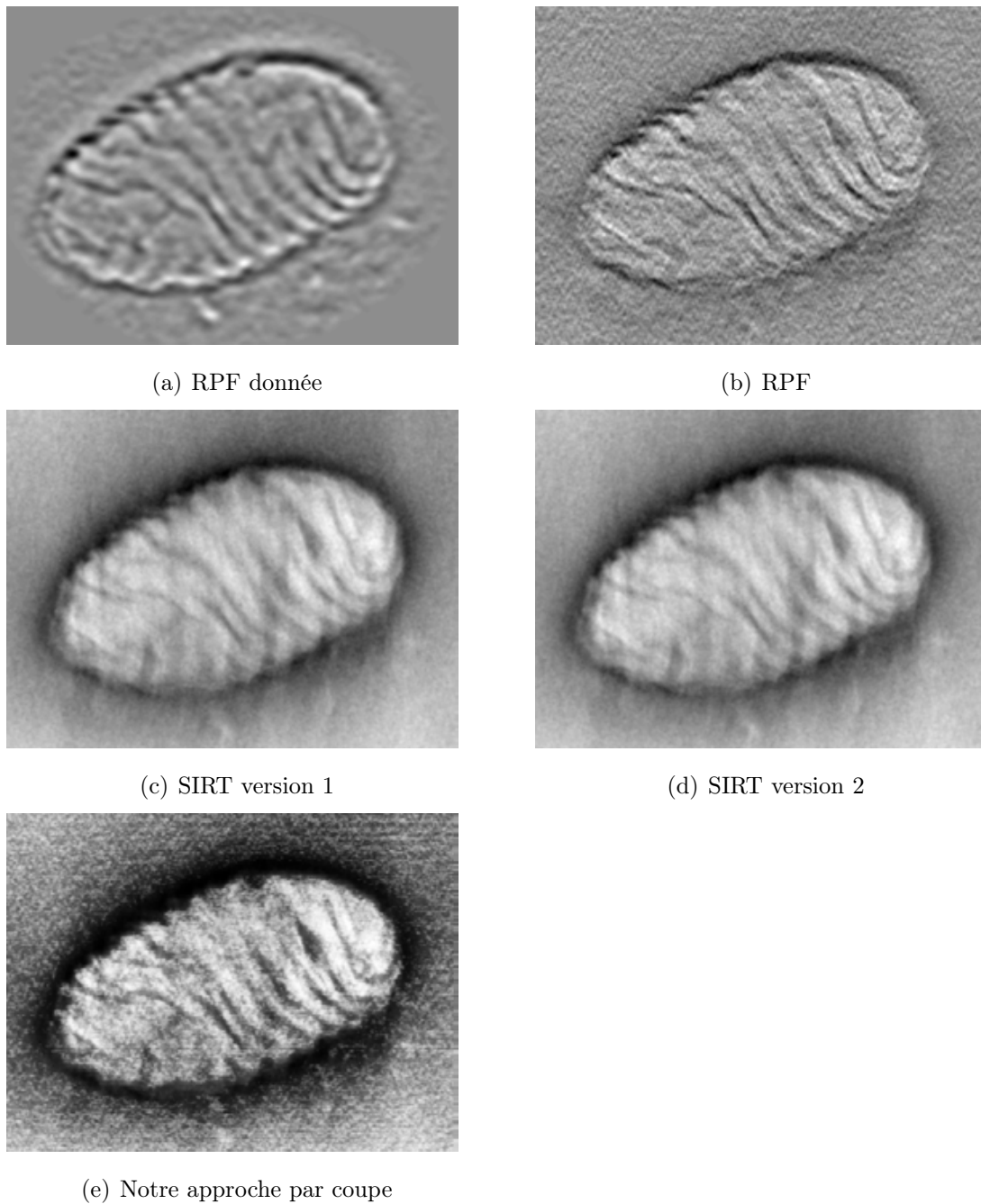
Nous avons utilisé la RPF et les deux versions de SIRT mentionnées dans les sections 2.2.1.3 et 2.2.2.3.2, ainsi que notre approche d'optimisation pour la reconstruction à partir des projections réelles.

La figure 3.18 présente une coupe de différents objets reconstruits. Pour évaluer la qualité de chaque objet, nous avons mesuré l'*EQMN* entre chaque objet reconstruit et la RPF donnée, ainsi que l'*EQMN* entre les projections de ces objets et les projections réelles. Les mesures sont données dans la figure 3.17.



**FIGURE 3.17** — L'*EQMN* entre les objets reconstruits (respectivement ses projections) par différentes méthodes et l'objet reconstruit par les experts (respectivement les projections réelles).

Nous constatons à partir de la figure 3.17, que la qualité de notre méthode est très proche de celle de l'objet donné par les experts. De plus, l'*EQMN* de notre reconstruction avec les projections réelles est la meilleure.



**FIGURE 3.18** — Une coupe d'objets reconstruits par différentes méthodes.



### 3.3.4 Cas 3D globale

Nous utilisons les mêmes protocoles de test que dans la section précédente. Toutefois, nous nous concentrons sur l'effet des paramètres de translation erronées. Nous appliquons les tests avec une déviation comprise entre  $[0^\circ \ 1^\circ]$  sur les orientations, et nous faisons une variation aléatoire de translation de 1, 2 et 3 pixels, sur les trois axes de l'espace. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.3. La *MCO* est calculée pour l'ensemble des transformations géométriques (translation et rotation).

**TABLE 3.3** — Les résultats pour différentes erreurs de translation.

Méthodes \ <i>ET</i>	0px	1px	2px	3px
Corr	0,94	0,93	0,93	0,91
MCO	0,36	0,38	0,39	0,42

Les résultats présentés dans la table 3.3 montrent la cohérence de notre approche qui obtient un facteur de corrélation supérieur à 0,9, signe d'une bonne qualité de l'objet trouvé après l'optimisation. Même avec l'augmentation des erreurs de translations la *MCO* reste dans la zone 0,4, ce qui signifie que plus de deux tiers de l'erreur géométrique a été corrigé. Ceci nous conduit à un résultat satisfaisant tenant en compte la correction des erreurs hétérogènes dans un espace discret. Sur ce test, la méthode 3D globale donne un meilleur résultat qu'avec la méthode 3D par coupe, ceci est logique car la première méthode prend en compte plus de corrections géométriques.

Dans ces tests, nous avons commencé le processus en diminuant l'échelle deux fois. Plusieurs paramètres affectent le temps d'exécution de l'algorithme, à savoir, le taux d'erreur sur les données, le nombre d'itérations choisi pour chaque échelle dans l'algorithme, la complexité des données à traiter. Pour ne pas augmenter le nombre de paramètres, nous avons calculé le temps d'exécution de l'algorithme dans les conditions idéales, qui sont :

- données synthétiques simples.
- aucune erreur n'a été ajoutée.
- l'algorithme s'exécute jusqu'à un seuil donné.

Nous avons trouvé dans ces tests que le temps d'exécution est d'environ  $8\times$  plus rapide quand on diminue par deux échelles. Nous présentons dans la figure 3.19 le temps d'exécution moyen en minute pour le traitement des volumes de différentes dimensions (de  $32^3$  pixels à  $256^3$  pixels).

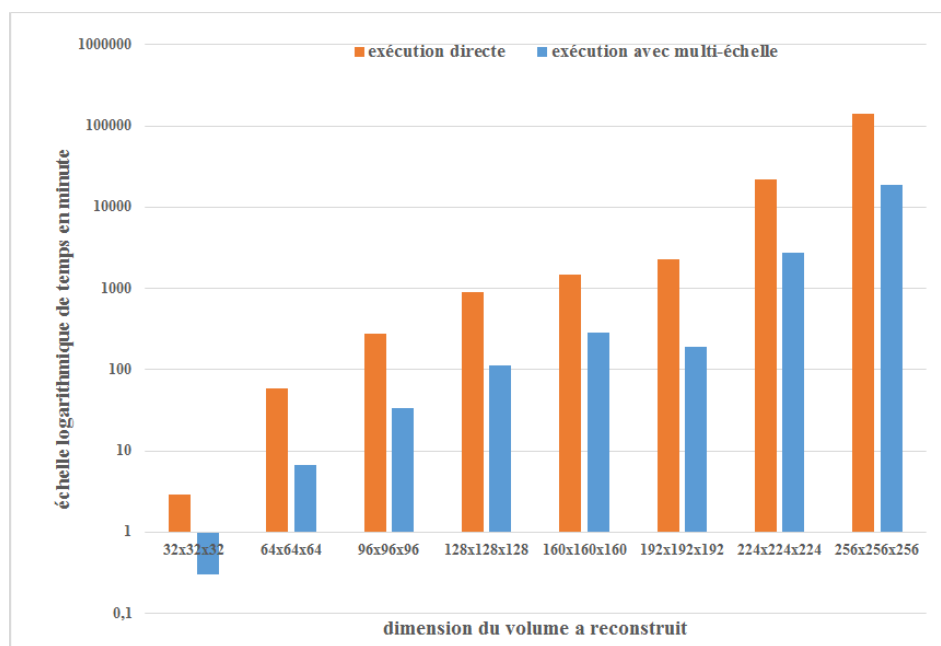
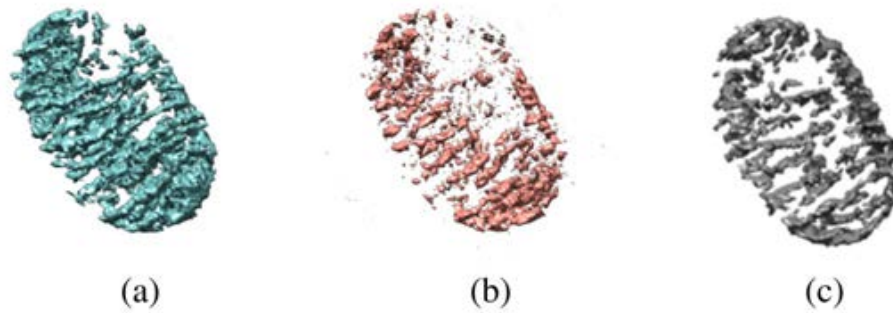


FIGURE 3.19 — Temps d'exécution moyen direct et multi-échelle.

Pour les tests réels, nous avons appliqué notre approche sur le jeu de données d'Orf-parapoxvirus. De plus, nous avons comparé notre résultat avec une reconstruction par SIRT réalisée par un alignement de la méthode de Plum *et al.* proposée dans [PMV03], qui est l'une des méthodes d'alignement par corrélation croisée la plus utilisée. Pour visualiser les objets reconstruits, un simple seuillage avec le même intervalle de niveaux de gris d'intérêt a été appliqué. Les résultats sont présentés dans la figure 3.20.



**FIGURE 3.20** — Reconstruction d’Orf-parapoxvirus : (a) par notre méthode ; (b) reconstruction après l’alignement par la méthode proposée dans [PMV03] ; (c) le volume reconstruit de référence.

Pour notre approche,  $L'EQMN$  entre les projections réelles et les re-projections de l’objet reconstruit est égal à 0,36.  $L'EQMN$  dégagé par la méthode de [PMV03] est de 0,67, celui qui est déduit du volume de référence est de 0,53. Ici, le meilleur score est à l’avantage de notre approche. Ceci s’explique par l’effet de la correction des angles appliqués ( $0,0847^\circ$ ).

Ainsi, notre méthode a pu reconstituer une partie de l’objet que les autres méthodes n’ont pas réussi à reconstruire. Une autre raison qui explique le bon résultat que nous avons obtenu vient de l’utilisation des images de projections filtrées par les autres méthodes. Ce filtrage permet d’améliorer l’interprétation du volume, mais aboutit à une perte d’information qui réduit l’efficacité de la reconstruction.

Un deuxième jeu de données réel est testé, celui des cellules eucaryotes (67 projections de taille  $256 \times 256$ , figure 3.21) acquises entre les angles  $-66^\circ$  et  $66^\circ$  avec un pas de  $2^\circ$ . Ce jeu de données est très bruité et d’une structure assez complexe. Ce jeu de données sera utilisé dans le prochain chapitre pour tester notre contribution au sein de la phase de segmentation.

Quelques coupes de l’image 3D reconstruite et l’objet lui-même sont présentées dans les figures 3.22 et 3.23.

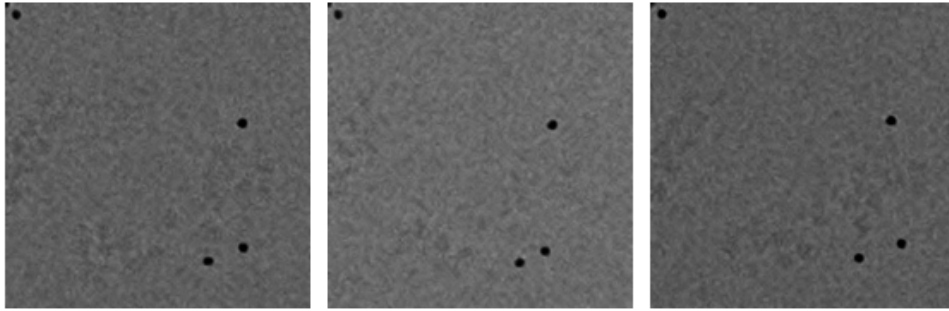


FIGURE 3.21 — Quelques projections des cellules eucaryotes.

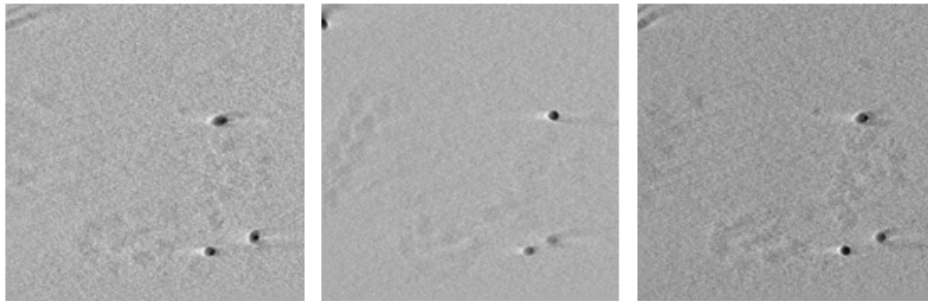


FIGURE 3.22 — Coupes de l'objet 3D reconstruit.

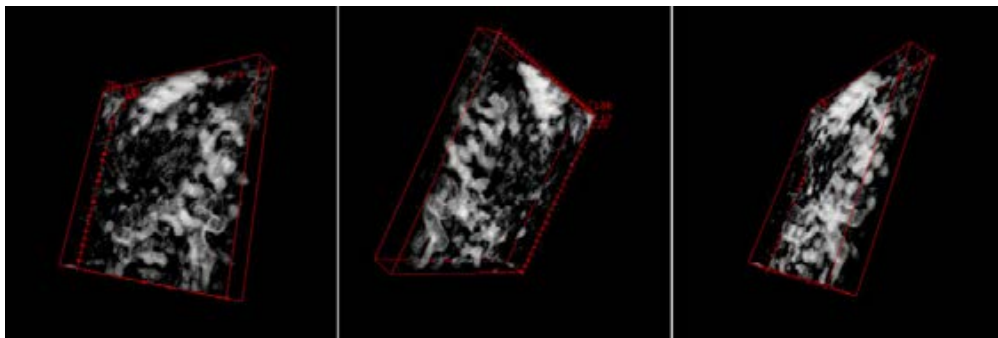


FIGURE 3.23 — Objet 3D reconstruit seuillé.

Nous n'avons pas une reconstruction de référence pour ce jeu de données, mais nous avons calculé l' $EQMN$  entre les projections réelles et les re-projections de

l'objet reconstruit par notre méthode et la méthode de [PMV03], les résultats sont respectivement 0,46 et 1,13. La méthode que nous avons utilisée nous a permis d'avoir un résultat avec une meilleure qualité que l'autre méthode utilisée, ce qui est remarquable comme résultat trouvé. La correction 3D utilisée par notre approche a été capable de traiter les transformations géométriques linéaires de ce jeu de données, ce qui n'est pas le cas pour les corrections 2D sur les projections.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une méthode pour affiner une reconstruction de l'objet à partir d'un ensemble de ses projections tomographiques et pour corriger en même temps les erreurs sur les transformations rigides, y compris les angles d'inclinaison utilisés. Notre point de départ était une approximation de l'objet (fourni par un algorithme de reconstruction) avec un ensemble d'angles d'inclinaison. Ensuite, nous avons minimisé la fonction de coût ayant comme paramètres les orientations, les facteurs de translation et l'objet lui-même. Cette réduction a été réalisée via le gradient conjugué. En outre, une approche multi-échelle est utilisée pour accélérer le processus d'optimisation. Nos expériences montrent que la méthode proposée améliore la reconstruction de l'objet par rapport à l'utilisation d'une méthode d'alignement 2D standard.

Dans le prochain chapitre, nous allons présenter les différents filtres de réduction du bruit utilisés comme pré-traitement pour la segmentation. Nous allons également présenter les différents algorithmes de segmentation des images tomographiques.

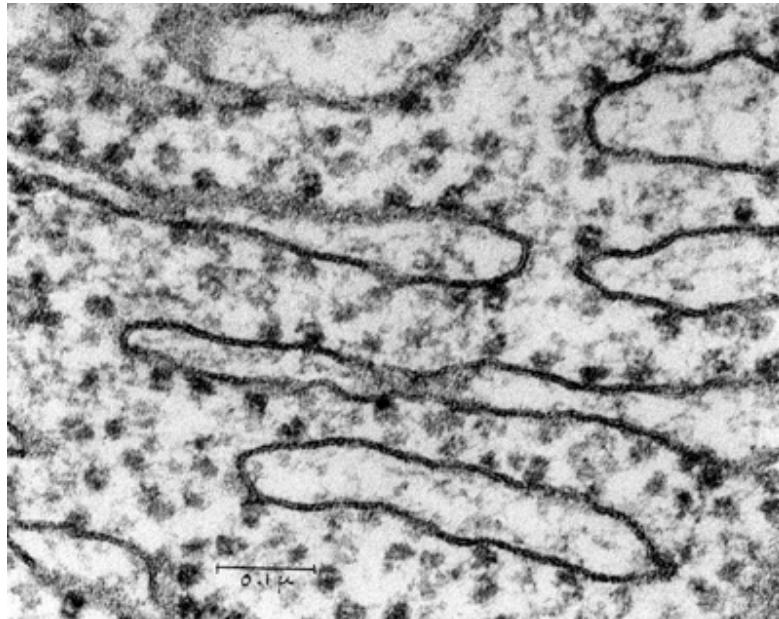
## Introduction

Le but principal de la segmentation est de décomposer une image en des parties ayant un sens sémantique [AK02]. D'autre part, nous pouvons donner une définition plus technique à la segmentation comme étant un problème d'extraction des formes qui ont en commun des caractéristiques comme l'intensité de couleur, la forme géométrique, la texture, . . . , [MS95].

Cependant, en se basant sur ces caractéristiques seulement, l'extraction des formes peut donner des résultats erronés de segmentation en tomographie électronique. En effet, ses résultats présentent habituellement un contraste inconstant, un faible rapport de signal bruit et des artefacts d'acquisition. Donc, une segmentation définie par un seul caractère d'extraction est très restreinte pour la tomographie électronique.

En outre, une méthode de segmentation idéale est capable de trouver tous les types de structures cellulaires existantes dans le tomogramme. Cependant, généralement, une méthode d'extraction de ribosomes (*c.f.* figure 4.1 forme circulaire) peut ne pas donner la même fiabilité d'extraction pour les membranes (*c.f.* figure

4.1 forme rectangulaire).



**FIGURE 4.1** — La synthèse des protéines de sécrétion. Notez les structures denses circulaires (les ribosomes) sur la membrane [Bio12].

Il est donc logique de considérer les problèmes de segmentation de ces structures comme des problèmes séparés. De plus, cela peut être utile si nous voulons trouver une seule structure désirée dans un tomogramme complexe, ou pour donner des labels uniques pour chaque structure trouvée pour rendre, par la suite, la visualisation plus facile et plus spécifique.

D'autres types de challenges existent pour la tomographie électronique :

- la variation dans le tomogramme qui ne peut pas être gérée par les méthodes de segmentation classiques. Cette variation est liée à la méthode de préparation de l'échantillon et aussi à la différence de structures biologiques qui existent dans le tomogramme [Fra06b],
- la résolution anisotrope liée à la zone aveugle du microscope électronique, où des parties de tomogramme peuvent être moins contrastées que d'autres. Ce problème peut être partiellement corrigé en utilisant la technique de doubles axes d'inclinaison [Mas99]. Cependant, et même avec ce type de correction,

nous ne pouvons pas avoir une résolution isotrope dans les tomogrammes 3D, alors, il faut que les méthodes de segmentation prennent en considération ces défauts de contraste,

- Les méthodes « Cryo » de préparation de l'échantillon biologique peuvent provoquer plusieurs types d'artefacts. En effet, comme le contraste est inconstant entre différentes parties du tomogramme, des fissures dans la surface de l'échantillon peuvent apparaître [PBW<sup>+</sup>12]. Ces problèmes affectent la capacité des méthodes de segmentation à établir la connectivité entre les régions de la même structure biologique.

Avec tous ces problèmes, le bruit de la phase d'acquisition augmente la difficulté de la segmentation. Donc, une réduction de ce bruit et une amélioration du contraste seront favorables pour améliorer la qualité d'extraction de structures.

Les méthodes d'amélioration de contraste sont principalement classées en deux catégories, i.e. spatiale et fréquentielle [PTS<sup>+</sup>13]. Cependant, les méthodes d'amélioration de contraste les plus populaires sont celles qui améliorent les niveaux de gris de l'image dans le domaine spatial. Ces méthodes sont : le filtre passe-bas, le filtre passe-haut, le filtrage homomorphique [CJB13]; égalisation d'histogramme [Hum75]; étirement de contraste [Yan06]; normalisation [LBHA13]; et la fonction sigmoïde [HA04]. Récemment, les techniques de modification de l'histogramme ont reçu beaucoup d'attention de la part des chercheurs en raison de leurs qualités d'application directe et instinctive et leur capacité d'être appliquées globalement ou localement à une image. Cependant, ces techniques ne parviennent pas souvent à fournir des résultats acceptables pour une large sélection d'images à faible contraste [ZLM<sup>+</sup>12].

Une autre technique d'amélioration du contraste : l'égalisation de l'histogramme qui est largement utilisé par les différentes applications d'imagerie en raison de sa facilité et sa rapidité [SB14]. Fondamentalement, l'égalisation de l'histogramme est obtenue grâce à la réaffectation des valeurs de pixels pour une image donnée. Cependant, des résultats médiocres ont été obtenus dans de nombreuses circonstances en raison d'inconvénients, tels que la perte de détails et l'amplification du bruit [ZCS13]. Une amélioration de l'égalisation de l'histogramme a été



proposée, connue sous le nom CLAHE [PAA<sup>+</sup>87] permettant de fournir un meilleur contraste pour les images traitées. Cependant, les résultats obtenus en appliquant cet algorithme sur des images tomographiques sont insuffisants. Ces limitations ont réduit la fiabilité des CLAHE à être utilisé comme une technique d'amélioration digne de confiance pour les routines cliniques modernes.

En outre, les filtres de débruitage dégradent le contraste tout en réduisant le bruit [ACLS10]. Par conséquent, des techniques spécialement conçus de débruitage doivent être appliqués pour obtenir des images bien contrastées.

## 4.1 Réduction de bruit

Le filtrage est une phase importante pour traiter le bruit généré par le microscope pendant l'acquisition. Le bruit est le fait de remplacer une partie des pixels de l'image avec des valeurs aberrantes, laissant le reste inchangé. Ce bruit peut être introduit en raison d'erreurs d'acquisition ou de transmission [PV92]. Le signal de sortie fourni par le microscope est formé d'impulsions aléatoires. Les théories connues indiquent que dans le cas de photoélectrons, l'ensemble des impulsions présente un processus de Poisson composé dont la variance dépend du signal, mais qui peut être approché par un bruit gaussien sous certaines conditions [Rou69]. Reimer [Rei98] a souligné le fait que le bruit soit généré par l'émission d'électrons primaire et qu'il augmente en proportion du signal utile. Ce bruit est ajouté en raison des fluctuations dans le nombre d'électrons du faisceau primaire émis. Donc, ce type de bruit suit une distribution de Poisson. Ce bruit est plus présent dans les images acquises par les microscopes avec des fusils thermoélectroniques [STP04]. Cizmar et al. [CVMP08] ont estimé que le bruit de l'image finale ne présente pas seulement une distribution de Poisson donnée par l'émission primaire d'électrons, mais aussi une distribution gaussienne (bruit blanc additif) produit par l'émission secondaire d'électrons. L'amélioration du rapport signal/bruit (**SNR**) est généralement appliquée à chaque tranche 2D du tomogramme 3D. Dans certains autres cas, les cellules acquises contiennent des sous-structures identiques répétées. Ces sous-structures

peuvent être pondérées pour améliorer le rapport du SNR [MWF<sup>+</sup>02, BEO<sup>+</sup>09].

### 4.1.1 Type de bruit

Une propriété qualitative du bruit de Poisson est que la variance du bruit est en fonction du signal et augmente avec leur intensité. Ce comportement est fondamentalement différent de ce qui est modélisé avec le bruit blanc gaussien additif pour laquelle l'intensité du bruit est uniforme et indépendante de la valeur du signal [MAOM14].

Le bruit blanc gaussien additif  $b$  d'un signal  $x$  est modélisé par :

$$y = x + b, |b \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2) \quad (4.1)$$

où  $y$  est l'image bruitée observée, et où l'écart type  $\sigma$  est supposé connu.

Dans le modèle de bruit de Poisson, chaque valeur de pixel  $y_k$  est supposée être le résultat d'un processus aléatoire de Poisson d'intensité  $x_k$  et indépendant de des autres pixels  $y_l$ . Le modèle est formulé par :

$$y \sim \mathcal{P}(x) \quad (4.2)$$

Les filtres existants de réduction du bruit peuvent être divisés en deux catégories : les filtres de base et les filtres plus complexes et avancés.

### 4.1.2 Filtres linéaires

Un des filtres les plus connus dans cette catégorie est le filtre passe-bas. Le but principal de ce type de filtre est de supprimer les hautes fréquences et de laisser passer les basses fréquences. Malheureusement, le filtre passe-bas ne discrimine pas entre le bruit et les informations de haute fréquence valides, ce qui provoque un effet « flou » plutôt qu'un vrai amortissement du bruit.

Afin d'utiliser le filtrage passe-bas sur les tomogrammes, les filtres de convolution par noyaux sont proposés. L'idée est d'utiliser une fenêtre pour pondérer la

moyenne des voxels (pixels) basée sur la proximité. Le bruit gaussien est le principal type de bruit impulsionnel présent dans ces images. De ce fait, le filtre gaussien est souvent utilisé dans les images de tomographie électronique [Fra06b]. Le filtre gaussien ([AW95]) est une méthode particulièrement efficace pour améliorer la détection de bord à l'aide d'une fonction gaussienne discrétisée pour calculer le poids à travers un noyau d'une taille donnée.

### 4.1.3 Filtres non-linéaires

Les filtres complexes maintiennent la fonction principale des filtres classiques (lissage et l'effet flou), mais ils sont conçus pour améliorer le bord des compartiments cellulaires dans la tomographie électronique, ou en d'autres termes « un lissage qui préserve les bords et les coins » (ECPS) [PPC07].

Plusieurs classes de filtres se trouvent dans cette catégorie, nous citons :

#### 4.1.3.1 Filtre médian

Le filtre médian est le filtre de rang fréquemment appliqué et utilisé dans la tomographie électronique [ACD09]. Contrairement aux filtres par noyau, les filtres par rang trient les valeurs au voisinage en se basant sur l'intensité ou le poids calculé en fonction de ces valeurs. Dans le filtre médian, le voxel traité est remplacé par la valeur médiane à partir de son voisinage. Il élimine efficacement le bruit impulsionnel en ignorant les valeurs extrêmes. En outre, si une petite fenêtre est utilisée, les voxels prendront une densité similaire à leurs voisins immédiats les plus importants, cela améliore les bords, ainsi que la cohérence d'intensité de la couleur. Comme la médiane est choisie parmi la liste triée des voisins, la valeur résultante sera identique à au moins un voisin, en évitant une valeur arbitraire potentiellement introduite par le bruit impulsionnel.

Comparé à d'autres filtres ECPS ou complexe, le filtrage par rang est plus efficace en forme d'exécution sur machine, avec une exigence modeste en termes d'espace mémoire. Cependant, lorsque la taille de la fenêtre est augmentée, le

nombre de valeurs à trier augmente, présentant un obstacle, même avec des algorithmes de tri rapide [HXM<sup>+</sup>07]. Des problèmes supplémentaires sont introduits avec l'augmentation de la taille de la fenêtre, à savoir, l'élimination possible des structures les plus petites que la moitié du voisinage de traitement, et la diminution de l'efficacité de réduction du bruit gaussien.

#### 4.1.3.2 Filtre Kuwahara

Le filtre Kuwahara [KHEK76] est une extension du filtre moyenneur, où on commence par utiliser une large fenêtre puis on divise cette fenêtre en des zones plus petites suivant les lignes médianes de la première fenêtre. La moyenne de chacune de ces petites sous-fenêtres est calculée et ensuite la variance des valeurs d'intensité est aussi calculée. Finalement, on remplace le pixel traité par la moyenne de la sous-fenêtre avec la plus petite variance.

Cette technique améliore les informations à basse fréquence telles que les bords et la cohérence, mais comme le filtre moyenneur, elle tend à introduire un effet de flou global, car elle ne fait aucune distinction entre les données à haute fréquence et le bruit impulsionnel. Cependant, une version améliorée du filtre Kuwahara développé par [BVVV99] combine le filtrage adaptatif aux orientations et le filtrage préservant les bords afin d'éviter ce problème.

#### 4.1.3.3 Filtre bilatéral

Le filtre bilatéral [TM98] est un filtre non linéaire où la valeur de chaque pixel est remplacée par un coefficient, déterminé par la distribution gaussienne de valeurs d'intensité de pixels voisins. Au lieu d'utiliser seulement des poids basés sur la distance euclidienne de pixels, nous pouvons utiliser aussi des différences radiométriques (par exemple la variance ou la distance dans l'espace d'intensité). Les valeurs de pixels d'une densité similaire au pixel d'intérêt sont pondérées plus fortement, ce qui entraîne une meilleure préservation de bords et de cohérences, en particulier lorsqu'on utilise une large fenêtre.

Cependant, dans le domaine de tomographie électronique, ce type de filtre souffre aussi de difficulté pour distinguer entre les hautes fréquences et le bruit impulsionnel. Afin de contrôler une telle situation, [PRH<sup>+</sup>06] a développé le filtre bilatéral discriminant. Ce dernier ajoute une deuxième fonction photométrique pour distinguer entre les bords et le bruit impulsionnel. En plus, la pondération de chaque pixel est calculée en fonction de sa différence de densité au pixel d'intérêt et chaque pixel est pondéré de façon indépendante par rapport à ses propres voisins. En outre, on lui attribue un poids de 0 si sa densité diffère du seuil donné.

#### 4.1.3.4 Filtre Mean Shift microscopique

Une version adaptée de Mean Shift [CM02] a été proposée pour la microscopie électronique par [BCSGF10] connu comme **XMSF** (Microscopy Mean Shift Filtering).

L'algorithme XMSF est défini comme suit :

1. Pour chaque pixel / voxel (« l'origine »), le centre de gravité de ses voisins (pondéré par l'intensité) est calculé. Le nouveau centre de gravité est calculé en tenant seulement compte des éléments qui se situent en deçà d'une distance spatiale donnée et dans une plage d'intensité donnée,
2. la nouvelle « origine » est ce pixel / voxel correspondant au barycentre calculé,
3. répéter les étapes 1 à 2 jusqu'à ce que le centre converge,
4. on affecte la valeur du dernier centre trouvé au pixel / voxel de début.

Il existe deux méthodes de calcul du centre, la première se base sur l'utilisation d'un noyau gaussien et la deuxième sur l'utilisation d'un noyau uniforme. La première est la méthode la plus lente, mais la plus précise pour la restauration de signal.

Mean-shift est similaire au filtrage bilatéral. Cependant, il le surpasse en qualité fournie grâce à l'utilisation des différentes données au cours des itérations de calcul des centres [SGCV06].

#### 4.1.3.5 Filtre des moyennes non locales

Tous les filtres mentionnés précédemment partagent la même idée : travailler dans le voisinage du pixel traité. Alors, pourquoi ne pas considérer les informations les plus éloignées des voisins ?

Buades *et al.* [BCM05] proposent le filtre des moyennes non locales qui exploite la corrélation dans la totalité de l'image. Ce filtre travaille avec l'hypothèse que les images naturelles comprennent de nombreux motifs répétitifs. Lorsque ces motifs sont identifiés et leurs moyennes sont calculées, le filtre enlève efficacement le bruit aléatoire sur les motifs similaires aux motifs qui sont utilisés.

Une nouvelle stratégie a été proposée par Dabov *et al.* [DFKE07], *Block-matching and 3D filtering* (BM3D), elle est basée sur un regroupement des fenêtres non locales 2D dans une structure 3D ou « un groupe ». Ensuite, un filtrage collaboratif est appliqué sur ces groupes 3D, ce filtrage est composé de trois étapes : une transformation tridimensionnelle de groupe, puis un filtrage et enfin un inverse de transformation tridimensionnel est effectué pour trouver des groupes des fenêtres 2D filtrées.

En plus, cet algorithme prend la variation de bruit dans l'image comme un paramètre d'entrée, pour donner un meilleur résultat que le filtre des moyennes non locales classique et en un temps de calcul raisonnable [DFKE07, BBSB<sup>+</sup>12].

Récemment, Kervrann *et al.* [KRW14] ont proposé une adaptation du filtre des moyennes non locales pour le cas de bruit mixte hétérogène inspiré de la méthode ABC (*Approximate Bayesian Computation*). Un des avantages de l'algorithme proposé est le fait qu'il peut gérer la structure du bruit sans un modèle de paramétrage précis de ce bruit.

#### 4.1.3.6 Filtre de diffusion anisotropique non-linéaire

La diffusion anisotropique non-linéaire est une généralisation proposée par Weickert [Wei99] de l'approche introduite par Perona et Malik [PM90], laquelle consiste à appliquer le processus physique de diffusion en traitement d'images. Par ailleurs,

Perona et Malik ont suggéré une modification au flux de la diffusion pour que l'effet de lissage soit réalisé selon la direction de la variation minimale (contours) au lieu de la traverser. Weickert met l'accent sur la cohérence de la continuité curviligne pour améliorer les structures communes. Dans le domaine de la tomographie électronique, Frangakis et Hegerl [FH01] ont proposé de combiner ces deux approches afin d'améliorer leurs performances. L'idée est d'utiliser les vecteurs et les valeurs propres de la structure des tenseurs de l'image qui présentent ensemble les caractéristiques structurelles locales de l'image dans un voisinage de taille  $\omega$ . Puis, une relation locale entre la structure des tenseurs de l'image et du bruit dans chaque voisinage peut être estimée pour l'utiliser comme un commutateur de choix d'application de l'une des deux approches (contour et cohérence). Une approche améliorée est proposée pour Fernández et Li [FL03], pour déterminer quelle structure sera renforcée (curviligne ou plan).

#### 4.1.4 Évaluation des algorithmes de filtrage

Nous avons appliqué les différentes méthodes de filtrage sur l'image tomographique des cellules eucaryotes par coupe (*cf.* figure 4.2).

Pour évaluer la performance de ces méthodes, nous avons utilisé le « PSNR » comme critère de performance. Le PSNR est exprimé en décibel (dB), c'est le ratio qui permet d'évaluer la ressemblance entre l'image originale et celle bruitée, plus il est fort et plus les images sont proches. A l'inverse, un faible PSNR indique qu'une partie de l'information de l'image est perdue.

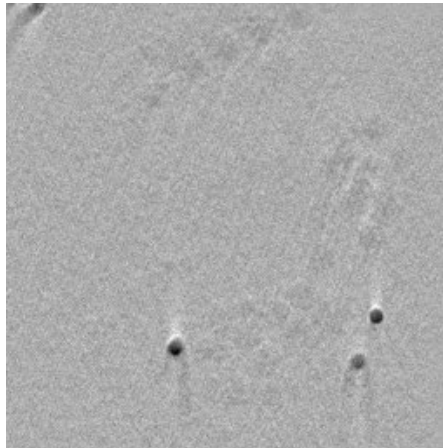
Le PSNR est donc le ratio entre le pouvoir maximum du signal et le pouvoir du signal bruité qui affecte la fidélité de la représentation.

$$PSNR = 10 \log_{10} \frac{L}{EQM} \quad (4.3)$$

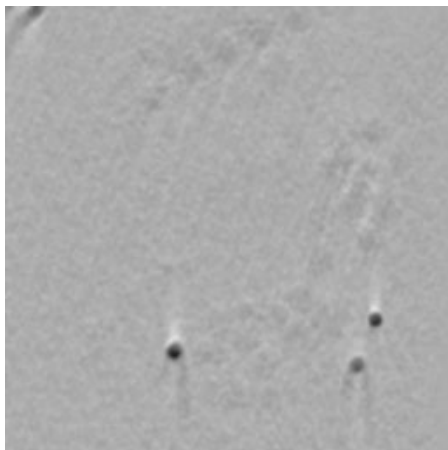
où  $L$  est la valeur maximale de niveau du gris possible pour un pixel,  $EQM$  est l'erreur quadratique moyenne entre l'image initiale et sa version améliorée.

Les résultats moyens sont présentés dans le tableau 4.1 et les images tomogra-

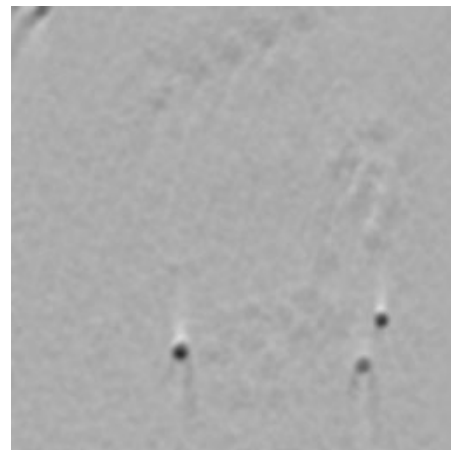
phiques des cellules eucaryotes résultantes sont présentées dans les figures 4.3 et 4.4.



**FIGURE 4.2** — Une coupe de l'image tomographique des cellules eucaryotes.



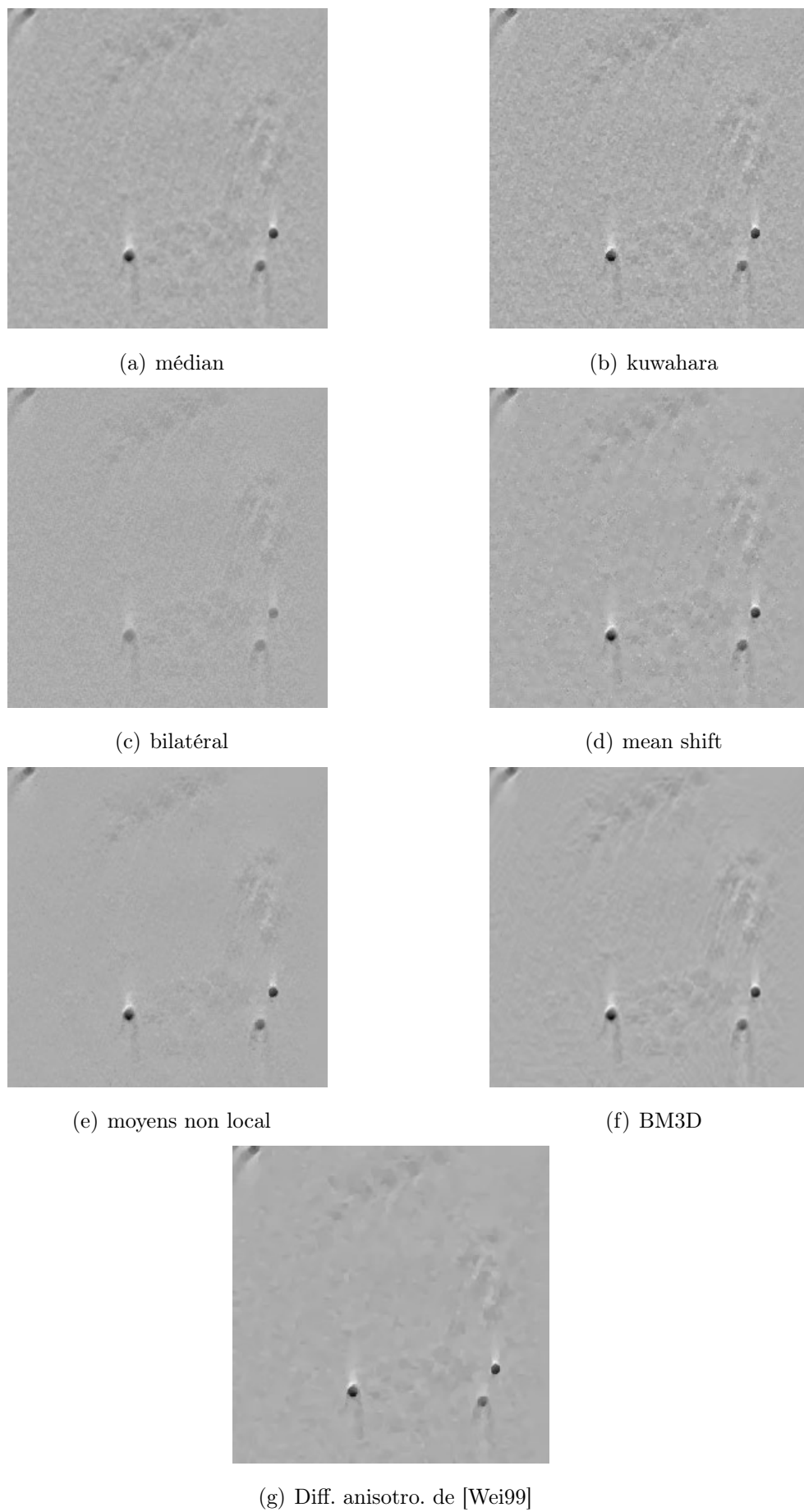
(a) gaussien



(b) moyenneur

**FIGURE 4.3** — Les filtres linéaires.



**FIGURE 4.4** — Les filtres non linéaires.

Filtre	PSNR
Image bruitée	9.624
Gaussien	11.001
Moyenueur	11.622
Médian	18.636
Kuwahara	14.239
Bilatéral	13.577
Mean Shift	17.377
Moyens non local	16.915
BM3D	26.852
Diffusion anisotropique de [Wei99]	25.353

**TABLE 4.1** — Moyenne de PSNR pour l'image tomographique des cellules eucaryotes 3D.

Ce tableau montre que les approches de filtrage non linéaires que nous avons appliqué sur des coupes 2D de l'image tomographique dégagent un PSNR meilleur que celui des approches de filtrage linéaires. Dans la famille non linéaire, l'algorithme BM3D donne le meilleur résultat, ce qui valide la confirmation des travaux antérieurs. C'est pour cette raison que nous avons utilisé le filtre BM3D dans la phase de prétraitement pour la segmentation.

## 4.2 Segmentation tomographique

Pour obtenir des informations quantitatives d'un volume 3D (*e.g.* volume, surface spécifique) reconstruit, il est indispensable de procéder par une segmentation. Il existe plusieurs algorithmes de segmentation dans la littérature. Leur performance dépend dans la plupart des cas du cadre applicatif, et il n'y a pas un seul algorithme qui fonctionne aussi bien avec les différents types de données [Fra06a]. Par conséquent, seuls les algorithmes qui utilisés dans le domaine de la tomogra-

phie électronique seront présentés dans cette section. Les approches automatiques, i.e. sans aucune intervention manuelle sont des méthodes globales utilisant l'histogramme de l'image, nous pouvons citer par exemple : les méthodes des nuées dynamiques (ou k-moyennes) [HW95], la maximisation de la variance interclasse (MVI) [Ots79], la maximisation de l'entropie [KSW85]. Le problème majeur de ces méthodes, c'est qu'elles ne fournissent pas d'information sur les niveaux de gris correspondant à chacune des classes. Pour résoudre ce problème, Batenburg et Sijbers [BS07] ont présenté une autre méthode de segmentation spécifique au contexte du volume tomographique, le principe de cette approche est de minimiser une distance, nommée « distance de projection », définie comme la différence entre les projections réelles et celles calculées à partir du volume reconstruit segmenté [BS09]. L'avantage majeur de cette méthode c'est qu'elle permet d'estimer les niveaux de gris correspondant à chacune des classes ainsi que les valeurs de seuil. Malgré cette richesse de la littérature sur la segmentation d'images, toutes les approches proposées ne peuvent pas fonctionner correctement sur les images de la tomographie électronique.

Dans cette section nous présentons en détail un état de l'art sur la segmentation tomographique par coupe 2D, 3D, hybride.

### 4.2.1 Contours actifs (modèle *snake*)

De nombreuses méthodes de segmentation sont basées sur l'optimisation d'une fonction choisie. Parmi ces algorithmes, *snake* est l'algorithme le plus ancien et le plus populaire. L'idée est d'utiliser une forme spline déformable qui est influencée et guidée par les forces de gradient radiométriques de l'image et des contraintes externes (i.e. paramètres donnés par l'utilisateur) qui tirent la spline vers les contours.

L'algorithme *snake* original utilise la fonction  $F$  définie par :

$$F(c) = \int_a^b |c'(s)| ds - \alpha \int_a^b |\nabla u_0(c(s))|^2 ds \quad (4.4)$$

Où  $c(s) = (x(s), y(s))$  est un contour différentiable soit avec des terminaux fixes ou périodiques, et  $u_0(x, y)$  est l'image à segmenter. L'inconvénient majeur de cette

méthode est qu'elle ne peut trouver qu'un seul contour pour chaque estimation initiale et ne peut pas gérer les changements dans les topologies, telles que la séparation d'un contour en deux. Un autre inconvénient est son incapacité à détecter les contours avec des courbures pointues et des formes non convexes. Elle exige également de l'utilisateur de spécifier une estimation initiale pour chaque structure. Toutefois, lorsqu'on segmente une structure 3D, l'utilisateur peut d'abord trouver tous les contours dans une tranche, puis utiliser ces contours comme des estimations initiales pour les tranches à proximité. Cette technique fonctionne bien si les structures sont bien séparées et ne changent pas de topologie entre les tranches. Ces changements de topologie peuvent se produire si une structure se sépare en deux branches lors du déplacement à travers la pile de tranches dans la tomographie.

#### 4.2.2 Ligne de partage des eaux (*watershed*)

L'algorithme *watershed* [BL79] est basé sur une idée simple, mais puissante inspirée par les reliefs topographiques. Nous pouvons penser à une image 2D comme une surface embarquée en 3D où l'altitude de la surface correspond à l'intensité de la couleur. Prenons une image où l'intensité des caractéristiques des formes extraites est plus sombre (altitude inférieure) à l'arrière-plan (niveau plus élevé). Nous perçons un trou dans chaque minimum local de la surface topographique et nous baissons la surface dans l'eau de telle sorte que l'eau commence à remplir les reliefs à travers les trous. Lorsque le niveau de l'eau dépasse les murs des objets, nous construisons un barrage le long de l'arête de ces murs pour empêcher la fusion des piscines d'eau des différents bassins. Ces barrages peuvent être utilisés comme des limites des régions associées aux différentes structures.

La sur-segmentation, où un objet est divisé en plusieurs morceaux, est un problème commun avec les données de la tomographie électronique, et pas seulement en utilisant *watershed*, mais pour plusieurs autres algorithmes de segmentation, en raison des niveaux élevés de bruit et du faible contraste. Pour surmonter ce problème, les bassins voisins avec des qualités similaires sont fusionnés, une fois l'inondation est complète. Même après un long prétraitement pour améliorer les

bords et supprimer le bruit, il est encore difficile de trouver un équilibre entre la sur-segmentation et la sous-segmentation générées. Afin de minimiser la nécessité de la fusion des bassins, une étape supplémentaire, dans une nouvelle version 3D du bassin versant, a été introduite par [Vol02]. Cette version est spécifiquement ciblée pour être utilisée sur les images de la tomographie. Il introduit un paramètre qui permet de préciser le taux d'immersion et d'autoriser plus de contrôles sur la fusion de lignes de *watershed*. Cette version marche bien pour certaines structures cellulaires, mais son inconvénient est le besoin d'un paramétrage spécifique pour chaque type d'image.

### 4.2.3 Approche hybride : *watersnake*

La méthode *snake*, présente l'avantage d'être efficace pour segmenter la structure subcellulaire [BYA03], mais présente également un inconvénient majeur : la convergence erronée du bord qui peut se produire lorsque les vrais bords sont brisés, ou sont brouillés par le bruit. D'autre part, la segmentation *watershed* a été présentée comme un outil puissant pour la segmentation [Vol02], mais son utilisation peut entraîner une sur-segmentation des tomographies électroniques bruyantes. Afin de surmonter ces problèmes, *watershed* et l'algorithme *snake* ont été fusionnés et « *watersnake* » a été proposé [NWVdB03]. *Watersnake* a été développé et testé. Il a été conçu pour surmonter les problèmes rencontrés avec la segmentation basée sur l'optimisation en utilisant la notion de distance topographique de la ligne de *watershed*. Deux avantages significatifs de *watersnake* ont été identifiés : l'amélioration des résultats de lissage et la réduction de la fusion indésirable de bord.

Au début, le *watersnake* n'était pas efficace sur les volumes de tomographie d'électrons d'échantillons biologiques. Cependant, dans une étude ultérieure [NJ08], les auteurs ont amélioré leur modèle d'origine en intégrant la connaissance préalable de la forme et les caractéristiques des structures cellulaires d'intérêt, ainsi que le cadre mathématique à adopter pour des volumes 3D. En se basant sur cette information supplémentaire, une méthode puissante a été développée pour

la segmentation automatique des structures cellulaires avec différents niveaux de complexité.

#### 4.2.4 Segmentation par vecteurs propres

La segmentation par vecteurs propres est basée sur la minimisation d'une fonction de coût global, qui exploite les informations fournies par tous les pixels d'une image représentant par une matrice d'affinité. L'objectif est de diviser l'image en deux parties, les zones d'intérêts et l'arrière-plan. Ce problème peut être formulé avec les valeurs et les vecteurs propres de la matrice d'affinité [SM97]. À la suite de cette formulation, le motif de connectivité qui minimise le critère de division peut être approximé par le deuxième plus petit vecteur propre de la matrice d'affinité. Cependant, dans la pratique, l'utilisation des niveaux de gris seulement produit une mauvaise segmentation [MS01]. Pour cette raison, Frangakis et Hegerl [FH02] ont proposé de coupler l'analyse par vecteurs propres à l'algorithme normalisé de coupe de graphe pour explorer une matrice d'affinité qui contient une mesure de similarité entre les pixels. Cette mesure est basée sur une combinaison du niveau de gris et de la distance euclidienne. La segmentation de l'image en plus de deux régions est réalisée par une application hiérarchique descendante de la procédure décrite sur chacune des régions trouvées. Cet algorithme a donné de bons résultats de segmentation pour une grande variété de types de données tomographiques [Fra06a].

#### 4.2.5 Segmentation par patches

À l'aide du système de patch comme celui utilisé dans les moyennes non locales, Kervrann *et al.* [KBC14] ont proposé de minimiser une estimation du maximum a posteriori avec des champs aléatoires conditionnels pour affecter des labels aux patches 2D en deux classes (objet d'intérêt, arrière-plan). Une segmentation semi-automatique en 3D est obtenue en appliquant cette procédure sur chaque tranche du volume 3D, tout en mettant à jour les patches de référence si le contraste de

l'image change.

### 4.2.6 Segmentation par seuillage

Parmi toutes les techniques de segmentation, le seuillage de l'image est la plus simple, mais pas la plus efficace. Habituellement, les algorithmes proposés pour ce contexte sont basés sur la sélection d'un seuil global par rapport à l'histogramme de l'image [Gla93]. Cette sélection est effectuée par de nombreuses techniques, par exemple, en accordant plusieurs distributions gaussiennes dans l'histogramme [SF04] ou en appliquant un algorithme K-means sur l'histogramme [HW95]. Ces méthodes utilisent seulement les informations existantes dans le tomogramme à segmenter sans aucune relation avec les données initiales que sont les projections. D'autre part, ces techniques utilisent un seuil global, sans tenir compte des niveaux d'intensité de chacune des régions.

### 4.2.7 Segmentation par seuillage à l'aide des projections réelles

Batenburg et Sijbers [BS08] ont proposé une approche pour pallier les problèmes mentionnés dans la section précédente dont le principe est de minimiser une distance, nommée « distance de projection », définie comme la différence entre les projections réelles et celle calculée à partir du volume reconstruit. Cette approche permet d'estimer des valeurs de seuils locales pour chacune des classes existantes.

Soit un objet  $\mathbf{f} \in \mathbb{R}^N$  tel que cet objet réel est composé de seulement  $s$  matériaux différents dont les valeurs d'intensité réelles  $\rho \in \mathbb{R}^s$  sont inconnues. Le but de la segmentation est d'assigner à un voxel d'intensité  $v$  une valeur de  $\rho$  selon la

fonction de seuillage suivante :

$$r_{\rho,l}(v) = \begin{cases} \rho_1 & \text{si } v < l_1 \\ \rho_2 & \text{si } l_1 \leq v < l_2 \\ \vdots & \\ \rho_s & \text{si } l_{s-1} \leq v \end{cases}$$

avec  $l \in \mathbb{R}^{s-1}$  les valeurs de seuil. La fonction de seuillage est appliquée à chaque voxel de l'objet reconstruit  $\mathbf{f}$  pour produire un objet segmenté :

$$r_{\rho,l}(\mathbf{f}) = (r_{\rho,l}(f_1), r_{\rho,l}(f_2), \dots, r_{\rho,l}(f_N)).$$

Batenburg et Sijbers définissent la distance de projection  $d(\rho, l)$  comme :

$$d(\rho, l) = \|\boldsymbol{\pi} - W r_{\rho,l}(\mathbf{f})\|_2.$$

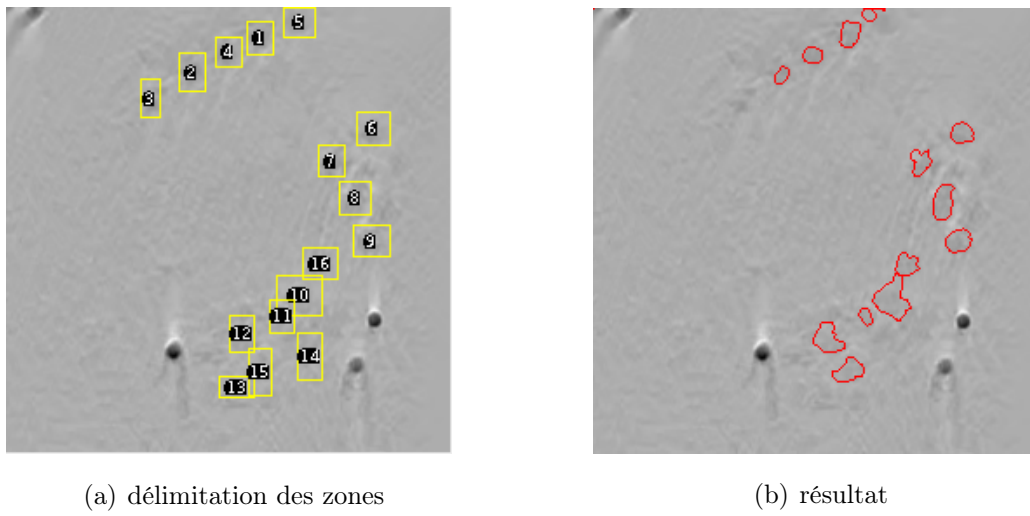
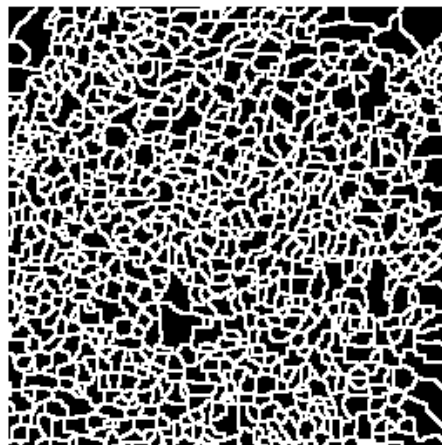
Où  $\boldsymbol{\pi} \in \mathbb{R}^M$  sont les projections réelles et  $W \in \mathbb{R}^{M \times N}$  est la matrice de projection.

Le problème de segmentation ici devient un problème d'optimisation qui consiste à chercher les arguments  $\rho$  et  $l$  qui minimisent la distance  $d$ . Une résolution de ce problème à l'aide de l'algorithme du Simplexe de Nelder et Mead est proposée dans [RBB<sup>+</sup>12].

#### 4.2.8 Évaluation des algorithmes de segmentaion

Nous avons testé les algorithmes les plus utilisés dans la tomographie à savoir : l'algorithme *snake*, *watershed* et les algorithmes de seuillages par seuil global et local. Les résultats sont décrits par les figures suivantes.



FIGURE 4.5 — L'algorithme *snake*.FIGURE 4.6 — L'algorithme *watershed*.

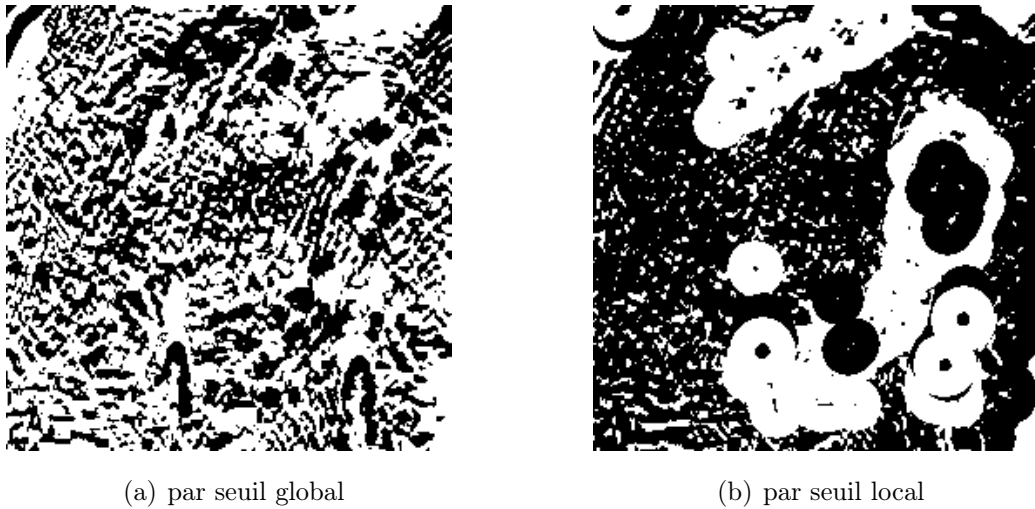


FIGURE 4.7 — Segmentation par seuillage.

Nous avons appliqué deux familles d’algorithmes pour détecter les ribosomes dans l’image des cellules eucaryotes. Pour la première famille d’algorithmes dite automatique, les résultats sont insatisfaisants comme l’illustrent les figures 4.7 et 4.6. En effet, l’algorithme *watershed* appliqué sur l’image génère une sur-segmentation de telle sorte que les traces de ribosomes sont brouillés dans l’image résultat. Aussi, le seuillage global confronté au faible contraste de l’image n’arrive pas à distinguer le ribosome du reste de l’image. L’application de seuil local, bien qu’elle dégage des composants connexes autour des zones d’intérêt, demeure insuffisante pour cerner de manière précise les contours du ribosome.

Par ailleurs, la deuxième famille d’algorithmes appelée semi-automatique (*cf.* figure 4.5), bien qu’elle s’appuie sur une phase manuelle de démarrage de l’algorithme de détection, elle se trouve confrontée au problème de l’omission et de la précision. En effet, l’une des méthodes le plus utilisées dans cette famille d’approche semi-automatique, la méthode *snake*, ne permet pas d’extraire fidèlement les ribosomes présents dans les zones délimitées manuellement dans la phase initiale de l’algorithme. La qualité de l’image tomographique demeure une contrainte qui empêche les approches classiques de fournir des résultats satisfaisants.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les différentes approches de filtrage et segmentation d'images tomographiques. Ces différentes approches, bien qu'elles offrent de bons résultats pour les images tomographiques simples, présentent des limites lors du passage vers les images avec une confusion radiométrique qui existe entre les structures qui les contiennent. C'est dans ce cadre que nous proposons une nouvelle approche multifractale qui fait l'objet du prochain chapitre.

Chapitre

# 5

---

## Extraction des ribosomes à partir de l'objet 3D reconstruit

### Introduction

Dans ce chapitre, nous exposons notre travail sur l'extraction du ribosome du volume 3D reconstruit. Nous allons introduire l'enchaînement des étapes qui aboutissent à l'isolement des composants ribosomes du reste de l'image et nous détaillerons le principe de l'extraction qui est basé sur une classification supervisée faisant intervenir une phase d'apprentissage pour la caractérisation du contenu de l'image.

### 5.1 Contraste de l'image tomographique

Nous avons étudié et appliqué plusieurs algorithmes d'extraction de contours sur l'image tomographique, l'objectif étant d'extraire les ribosomes et de permettre leur étude in situ par les biologistes. Ces algorithmes font partie des méthodes usuelles de segmentation (*e.g. watershed*, contour actif, seuillage), les résultats qu'ils fournissent (présentés dans le chapitre précédent) ne sont pas satisfaisants

car la qualité de l'image tomographique des cellules eucaryotes est très faible du côté du contraste et de la distribution des niveaux de gris dans l'image. Nous nous sommes focalisés au début de nos travaux sur la classification de la composante 2D de l'objet reconstruit. Les classes retenues sont :

- Le ribosome
- Le solvant
- La particule d'or

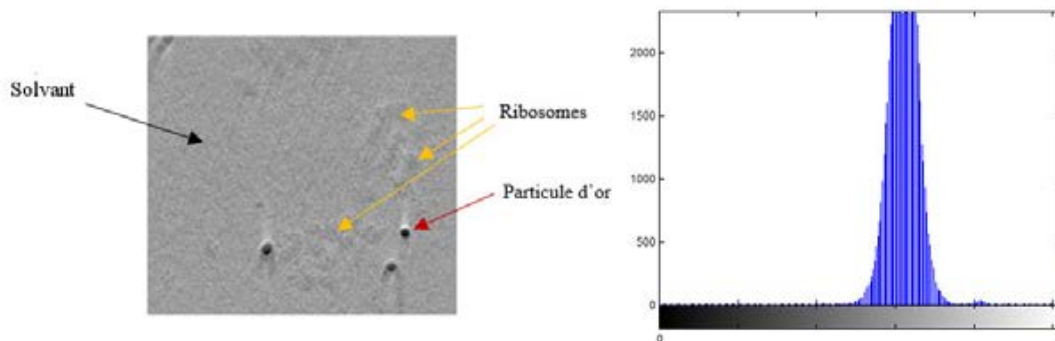


FIGURE 5.1 — Qualité de l'image tomographique

La figure 5.1 illustre une coupe de l'image 3D tomographique reconstruite. Elle révèle une difficulté de distinction des ribosomes par rapport au solvant qui les entoure. Cette difficulté est confirmée par l'analyse de l'histogramme de l'image dont l'allure ne montre pas une séparation entre plages de niveaux.

C'est ainsi que l'application de l'algorithme de *watershed* sur l'image génère une sur-segmentation expliquée par le manque d'homogénéité locale.

L'application du contour actif sur l'image tomographique se trouve confrontée au même problème. La convergence et la localisation de la formation du ribosome souffrent de la faiblesse entre énergie interne et énergie externe de l'objet à entourer.

Aussi, les techniques de seuillages que nous avons appliquées sur l'image tomographique brute pour la segmentation ont fourni des résultats non satisfaisants à

cause de rapprochement de la plage des niveaux de gris entre ribosome et solvant.

Les expérimentations que nous avons menées sur l'image tomographique de cellules eucaryotes nous ont permis de dégager les conclusions suivantes :

- La nécessité d'appliquer une transformation sur l'image brute afin d'améliorer sa qualité, renforcer son homogénéité locale.
- Introduire une approche de segmentation basée sur une phase de classification supervisée. Ceci est justifié par le nombre réduit de classes et notre orientation de nous focaliser sur la classe des ribosomes. La segmentation souhaitée devra en effet dégager de l'image tomographique les ribosomes et préciser leurs formes et contours.

Nous présentons dans ce qui suit notre approche de segmentation basée sur une phase de transformation des données brutes de l'image tomographique et une phase de classification permettant de caractériser les ribosomes afin de les extraire.

## 5.2 Filtrage de l'image tomographique

Bien que l'analyse visuelle et qualitative de l'image tomographique ainsi que l'étude de son histogramme révèle un faible contraste entre le ribosome et le solvant, elle informe sur une texture significative de la formation des ribosomes.

### 5.2.1 Texture

La texture constitue un élément important en traitement d'image. Ainsi, diverses études sur la texture, sa caractérisation, et sa formulation ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche [JI12]. La texture est définie par la variation spatiale des intensités d'une région donnée dans l'image. Smith et Chang [SC96] ont défini la texture comme un motif visuel contenant des différentes intensités de couleurs avec des propriétés homogènes. Par conséquent, l'analyse des paramètres de texture et leur prise en compte dans l'interprétation des images biologiques trouve un champ d'application vaste.

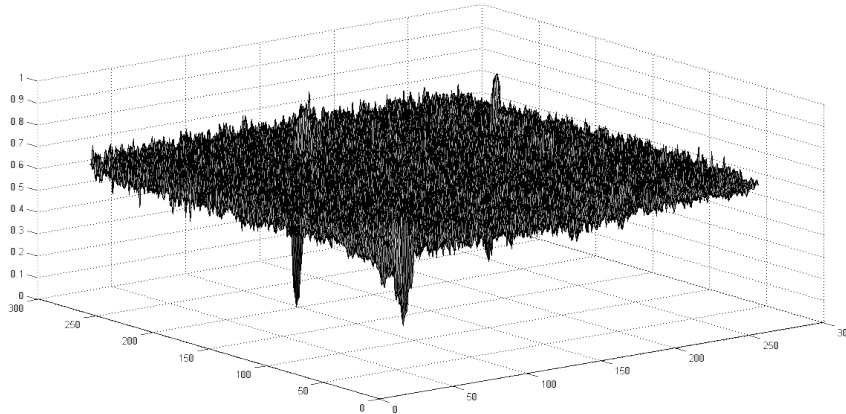
Les images biologiques ont généralement une résolution faible, un bruit élevé, et des textures variées. Le bruit dans les images biologiques rend leur interprétation difficile. Ainsi, un débruitage est nécessaire avant l'analyse des images biologiques [LBU07]. Le débruitage dans la microscopie électronique est souvent réalisé par des filtres spatiaux simples comme le filtre gaussien, le filtre médian ou le filtre de Wiener [NP98, KHB<sup>+</sup>12]. Ces filtres sont efficaces dans le cas où les images correspondent à des spécimens suffisamment solides pour supporter une forte dose d'électrons [MBD<sup>+</sup>15]. Pour les images biologiques des spécimens ne supportant qu'une faible dose d'électrons, quelques outils sont introduits pour le filtrage [Klu79, HSF<sup>+</sup>84, Hov92]. Ces méthodes sont principalement basées sur la manipulation de l'image dans l'espace de Fourier.

Elles améliorent la qualité de l'image pour le cas de la haute résolution du MET de matières biologiques. Cependant, elles sont étroitement liées à la périodicité des données et n'ont donc pas été largement adoptées.

Le filtre des moyennes non locales [BCM05] et le filtre BM3D [DFKE07] sont aussi des méthodes de débruitage qui ont été employées dans les images biologiques. La propriété principale de ces deux filtres est de supprimer le bruit blanc gaussien additif [WY10, BBSB<sup>+</sup>12]. Cependant, il n'est pas capable d'enlever le bruit multiplicatif de Poisson qui est la forme dominante de bruit dans les images MET à faible dose [MKS99, MBD<sup>+</sup>15]. D'autres méthodes comme [LBU11, ZFS08], qui sont basées sur la transformée d'ondelette où le filtrage est appliqué dans l'espace d'ondelette puis une reconstruction est réalisée pour trouver l'image filtrée. Une perte d'informations est provoquée par ce changement d'espace qui dans notre cas n'est pas toléré.

La nature du bruit de Poisson (*cf.* section 4.1.1) rend le signal de l'image non stationnaire (i.e. des fortes variations de niveaux de gris). Une distribution de niveaux de gris non stationnaire augmente la difficulté de détection de l'objet d'intérêt. Cependant, Turiel et al. [TP00a] ont réussi à montrer que l'image de la norme du gradient appliqué sur les distributions marginales du signal (image après normalisation) est stationnaire et que les transitions sont très courtes (i.e. des faibles variations de niveaux de gris). L'utilisation exclusive du gradient dans

la segmentation n'est certainement pas la bonne piste, car le gradient ne conserve que les informations à haute fréquence.



**FIGURE 5.2** — Signal non stationnaire de l'image de projection de la figure 5.1.

Donc, ressort l'intérêt d'appliquer une transformation qui améliore l'homogénéité locale et qui arrive à stabiliser et à améliorer la qualité de l'image et à résoudre le problème de confusion de contenu informationnel dans l'image. Nous avons étudié différentes transformées existantes et leurs apports dans l'amélioration de la qualité de l'image de sortie. Notre intérêt a été orienté vers deux transformées réputées par leur capacité à accentuer l'homogénéité locale [Dhi11, CCX11] à savoir :

- L'intégration fractionnaire : appelée aussi intégration non entière. Le filtrage basé sur le calcul fractionnaire. Le résultat dépend du choix des ordres de dérivation (positif ou négatif).
- L'analyse multi-fractale : les outils fractales et multi-fractales permettent de décrire les textures et de les lier aux items que l'on cherche à séparer. Ces outils permettent de détecter les singularités dans l'image (composante intensité) afin d'obtenir une description locale et globale.

Ces transformées sont choisies pour leur relation avec le gradient afin de stabiliser le signal de l'image. La première est une généralisation du gradient sans perte des informations à basse fréquence, et la deuxième utilise le gradient au cœur de son calcul.



## 5.2.2 Méthodes proposées pour le débruitage

### 5.2.2.1 Intégration fractionnaire

Généralement, l'application du gradient sur l'image a pour but de délimiter les contours (hautes fréquences) de l'objet et ceci en ne tenant compte d'aucune autre information dans l'image. Par contre, l'opérateur d'intégration fractionnaire présente l'intérêt d'avoir un comportement hybride, qui permet d'améliorer l'homogénéité locale des basses fréquences et accentuer aussi les hautes fréquences.

Le formalisme de la dérivation non entière consiste à généraliser la notion de dérivée à des ordres non entiers de dérivation. Ces derniers peuvent être réels ou complexes. La dérivation fractionnaire est abordée dès 1695 par Leibnitz qui se posait une question « Quelle pourrait être la dérivée d'ordre un demi de la fonction  $x$  ? ».

De nombreux mathématiciens se sont penchés sur cette question, en particulier Euler (1730), Fourier (1822), Abel (1823), Liouville (1832), Riemann (1847) [DGP09]. Plusieurs approches ont été utilisées pour généraliser la notion de dérivation aux ordres non-entiers dont [SAM07] :

- La limite du taux d'accroissement d'une fonction
- L'intégration, opération inverse, via la formule intégrale de Liouville.
- Les transformations de Fourier et de Laplace.

#### 5.2.2.1.1 Approche de Riemann-Liouville

L'intégration fractionnaire d'ordre non entier  $\alpha \in ]0, 1[$  d'une fonction  $u : \mathbb{R}^+ \rightarrow \mathbb{R}$ , consiste en une convolution définie comme suite (formule de Riemann-Liouville) :

$$I^\alpha u(t) = \frac{1}{\Gamma(\alpha)} \int_0^{t^{\alpha-1}} u(\tau) d\tau, \quad (5.1)$$

où  $\Gamma$  est la fonction Gamma définie par l'expression suivante :

$$\Gamma(\alpha) = \int_0^{+\infty} t^{\alpha-1} \exp(-t) dt, \quad (5.2)$$

De manière similaire, on définit la dérivée fractionnaire d'ordre  $\alpha \in ]0, 1[$  :

$$D^\alpha u(t) = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dt} \int_0^t \frac{r(\tau)}{(t-\tau)^\alpha} d\tau, \quad (5.3)$$

### 5.2.2.1.2 Calcul fractionnaire dans le traitement d'image

Les algorithmes de calcul fractionnaires peuvent être classés en deux groupes, la dérivation fractionnaire et l'intégration fractionnaire. Si l'ordre utilisé dans le calcul fractionnaire est positif, l'opération est une dérivation, sinon, l'opération est une intégration [KST06]. Le calcul fractionnaire a fait l'objet d'intérêt considérable de diverses applications de traitement d'image, telles que le débruitage d'image [HPZ11, GLQIMr12] et l'amélioration de la texture [JI12, JI13a].

Les composants à haute fréquence (par exemple, les bords et le bruit) sont caractérisés par de grands changements dans les niveaux de gris sur de petites fenêtres. Par contre, les composantes à basse fréquence (par exemple, les arrières-plans et les textures) sont caractérisées par de petits changements dans les niveaux de gris [McA04]. La propriété non linéaire du calcul fractionnaire (particulièrement, le calcul d'intégration) conserve les caractéristiques marginales des composants aux hautes fréquences et améliore aussi les détails de texture [JI13b].

Dans le cas des images tomographiques et particulièrement pour le besoin de séparation d'objets, l'application du calcul fractionnaire se justifie par la capacité de ce traitement à renforcer l'homogénéité locale et accentuer les contours pour faciliter l'extraction des objets.

Plusieurs travaux ont utilisé du calcul fractionnaire pour améliorer l'image de texture. Cependant, les opérateurs fractionnaires utilisés dans ces approches sont sensibles au bruit. Afin de résoudre ce problème, un nouvel opérateur fractionnaire Savitzky-Golay, qui généralise le filtre Savitzky-Golay de l'ordre entier en ordre fractionnaire, a été proposé et appliqué dans l'amélioration de texture par Chen *et al.* [CCX11, CCX12, CXC13].

### 5.2.2.1.3 Filtre Savitzky-Golay

Chen *et al.* ont estimé la dérivée d'ordre  $dn$  de l'opérateur Savitzky-Golay pour un signal 2D avec une fenêtre de filtrage d' $I$  points et un polynôme d'ordre  $n$ . Compte tenu un signal uniformément échantillonné  $Y = [y_1, y_2, \dots, y_I]^T$ , en utilisant l'opérateur Savitzky-Golay, la dérivée d'ordre  $dn$  du  $i^e$  point du signal,  $\widehat{Y}_i^{(dn)}$ , peut-être estimée par

$$\widehat{Y}_i^{(dn)} = W_i^{(dn)} Y = \underbrace{[0, \dots, 0, dn!, \dots, P_n^{dn} i^{n-dn}]}_{dn} (X^T X)^{-1} X^T Y, \quad (5.4)$$

où  $W_i^{(dn)}$  dénote le vecteur de coefficient de la dérivée d'ordre  $dn$  de l' $i^e$  point dans la fenêtre de filtrage et la permutation  $P_n^{dn} = n!/(n-dn)!$ .  $X$  est la  $I \times (n+1)$  matrice de Vandermonde définie par

$$X = \begin{bmatrix} 1 & 1^1 & \dots & 1^n \\ 1 & 2^1 & \dots & 2^n \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & I^1 & \dots & I^n \end{bmatrix} \quad (5.5)$$

Lorsque  $dn$  est nul, l'équation (5.4) est capable de lisser le signal donné. En se basant sur la définition fractionnaire de Riemann-Liouville, la généralisation de l'équation (5.4) de l'ordre entier à l'ordre fractionnaire devient possible par la formule suivante :

$$\widehat{Y}_i^{(\alpha)} = W_i^{(\alpha)} Y = \left[ \frac{\Gamma(1)}{\Gamma(1-\alpha)} i^{-\alpha}, \dots, \frac{\Gamma(n+1)}{\Gamma(n+1-\alpha)} i^{n-\alpha} \right] (X^T X)^{-1} X^T Y, \quad (5.6)$$

où  $\alpha$  est l'ordre fractionnaire. Quand  $\alpha$  est un entier, l'équation (5.6) est égale à l'équation (5.4). Plus de détails sont trouvés dans [CCX12]. Supposons que la taille de la fenêtre de filtrage est  $I = 2m + 1$ , et  $m$  un entier positif. En utilisant l'équation (5.6), la dérivée d'ordre  $\alpha$  du point central de la fenêtre de filtrage peut être estimée par le vecteur de coefficients :

$$W_{m+1}^\alpha = [W(1), W(2), \dots, W(2m+1)]. \quad (5.7)$$

Alors, huit modèles de direction sont définis et présentés dans la figure 5.3.

FIGURE 5.3 — Huit modèles de direction [CCX12].

Soit  $G(x, y)$  l'intensité de gris du pixel  $(x, y)$  de l'image  $G$ . À l'aide de huit modèles proposés, la dérivée de l'ordre  $\alpha$  de  $G(x, y)$  dans les différentes directions est calculée par :

$$G_d^{(\alpha)}(x, y) = \sum_{k=-m}^m \sum_{l=-m}^m W_d^{(\alpha)}(k, l) G(x - k, y - l), \quad (5.8)$$

où  $d \in \Omega | \Omega := x+, x-, y+, y-, \nearrow, \searrow, \swarrow, \nwarrow$ .

En utilisant les dérivées fractionnaires dans les huit directions, la dérivée de l'ordre  $\alpha$  de  $G(x, y)$  est défini par :

$$G^{(\alpha)}(x, y) = Sat(\max\{G_d^{(\alpha)}(x, y) | d \in \Omega\}), \quad (5.9)$$

et  $Sat(\cdot)$  est la fonction de saturation définie par

$$Sat(u) = \begin{cases} 0, & u < 0, \\ u, & u \in [0, L], \\ L, & u > L \end{cases} \quad (5.10)$$

où  $L$  est le niveau maximal de gris utilisé dans l'image  $G$  et  $G^{(\alpha)}$  est l'image de la dérivée.

#### 5.2.2.1.4 Filtre Savitzky-Golay par moyenne proposé

Nous avons appliqué le filtrage par intégration fractionnaire sur l'image tomographique. La figure 5.4 illustre le résultat de l'application de cette transformée sur une coupe 2D de l'objet reconstruit.

L'analyse du résultat de cette transformée montre la capacité de l'intégration fractionnaire à faire apparaître le ribosome et à mieux le distinguer par rapport à la plage des niveaux de solvant. En effet, l'histogramme (f) de la figure 5.4 de l'image obtenue suite à l'application du calcul fractionnaire illustre un contraste meilleur et une distinction d'une nouvelle région qui prend place dans l'histogramme.

L'alternative de Chen *et al.* d'utiliser la fonction  $\max(\cdot)$  pour trouver l'image fractionnaire finale retient la plus grande valeur dans les différentes directions. Ceci a comme conséquence d'augmenter l'effet de bruit pour les images bruitées.

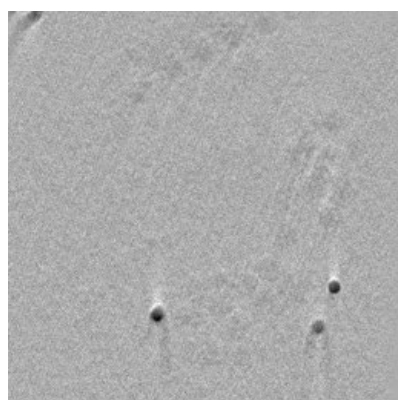
Pour cette raison, nous avons choisi de modifier ce filtre et d'utiliser la moyenne entre les valeurs des différentes directions comme valeur fractionnaire afin d'accroître l'homogénéité locale de l'image. L'application de l'intégration fractionnaire sur des coupes de l'image tomographique de cellules eucaryotes valide notre choix.

La figure 5.4 montre que l'intégration fractionnaire par moyenne (notre approche) offre un résultat meilleur que celui obtenu avec la fonction  $\max(\cdot)$  (Chen *et al.*). Ceci est expliqué à la fois par l'analyse visuelle des deux images et leurs histogrammes respectifs.

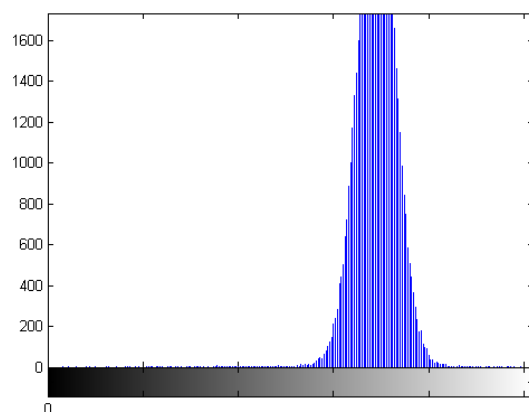
Les résultats obtenus sur des coupes 2D de l'image tomographique nous ont motivé à généraliser l'approche pour le cas 3D.

#### 5.2.2.1.5 Opérateur Savitzky-Golay 3D

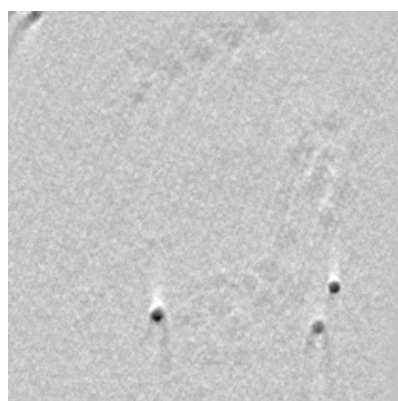
L'intégration fractionnaire sur des données 3D que nous introduisons est inspirée de l'équation (5.7). Pour le cas 2D, huit directions différentes sont utilisées. Pour le cas 3D, nous avons généré dix-huit cubes de directions différentes.



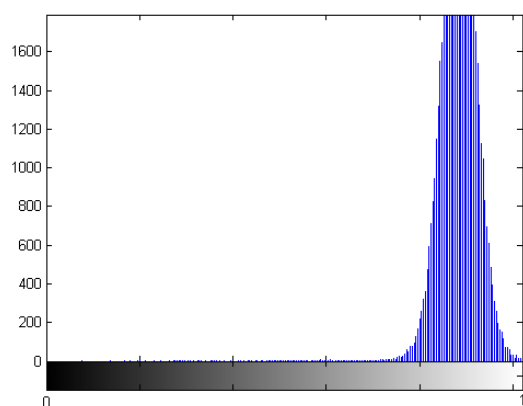
(a) image brute



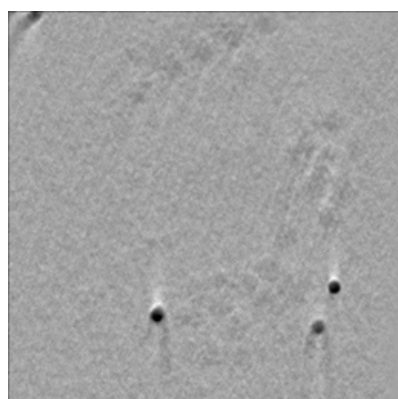
(b) histogramme de 5.4(a)



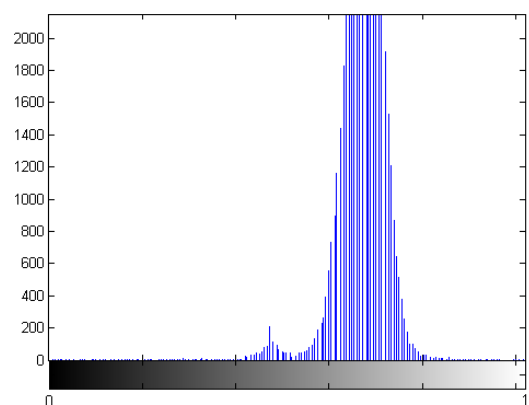
(c) intégration par Chen *et al.*



(d) histogramme de 5.4(c)



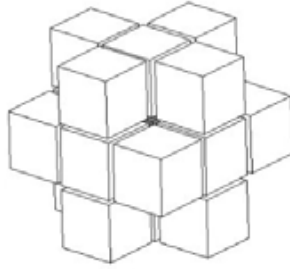
(e) notre intégration



(f) histogramme de 5.4(e)

**FIGURE 5.4** — Application de l'intégration sur l'image tomographique.

Les dix-huit voxels sont voisins du voxel d'intérêt qui touche l'une de leurs faces ou arêtes. Ces voxels sont reliés par 8-connexité sur chaque plan de l'espace 3D (*cf.* figure 5.5).

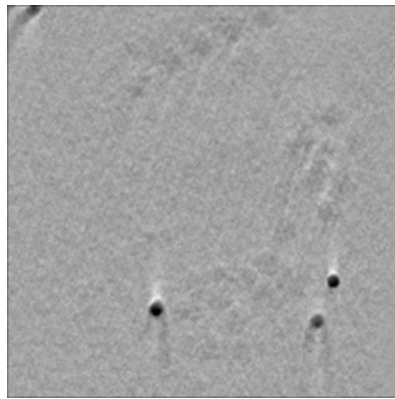


**FIGURE 5.5** — 18-connexité (par voxels).

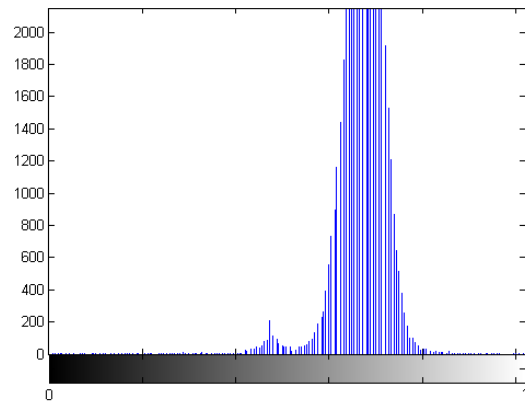
Si nous décomposons la forme de connexité 3D sur les trois plans OX, OY, OZ, nous trouvons que chaque plan contient les huit directions données par Chen *et al.*, d'où vient le choix de cette connexité. En d'autres termes, les 18 voxels connectés sont les voisins du voxel d'intérêt qui touchent l'une de leurs faces ou arêtes. Ces voxels sont reliés le long de l'un ou deux des axes principaux. Pour un voisinage de  $3 \times 3 \times 3$ , les voxels voisins du voxel  $(x, y, z)$  sont :

$(x \pm 1, y, z)$ ,  $(x, y \pm 1, z)$ ,  $(x, y, z \pm 1)$ ,  $(x \pm 1, y \pm 1, z)$ ,  $(x \pm 1, y \mp 1, z)$ ,  $(x \pm 1, y, z \pm 1)$ ,  $(x \pm 1, y, z \mp 1)$ ,  $(x, y \pm 1, z \pm 1)$  et  $(x, y \pm 1, z \mp 1)$  [CPH09].

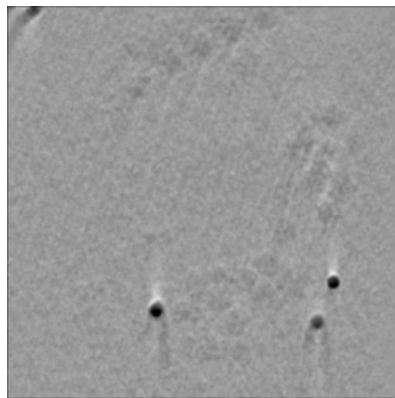
Nous avons appliqué le filtrage par intégration fractionnaire sur l'image tomographique 3D. La figure 5.6 illustre le résultat sur une coupe 2D de l'objet reconstruit. Le résultat se réfère à une fenêtre de l'image tomographique de cellules eucaryotes, les autres fenêtres que nous avons expérimentés (et qui contiennent des traces de ribosomes) fournissent un résultat comparable. Nous exposons plus de tests dans la section 5.2.3.2 et nous évaluons notre approche par rapport à d'autres méthodes classiques. Dans la section suivante, nous passons en revue la deuxième approche à tester, l'analyse multi-fractale.



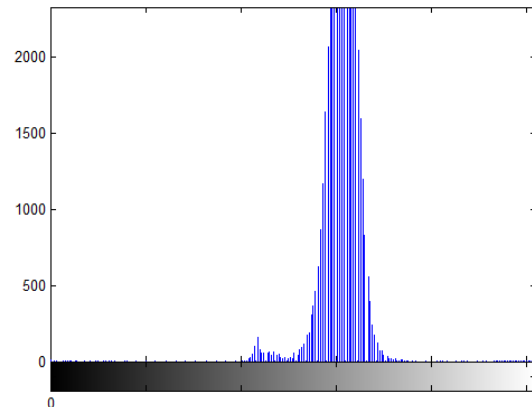
(a) notre intégration 2D



(b) histogramme de 5.6(a)



(c) notre intégration 3D



(d) histogramme de 5.6(c)

**FIGURE 5.6** — Application de l'intégration 3D sur l'image tomographique.

## 5.2.2.2 Analyse multi-fractale

### 5.2.2.2.1 Définitions

Les fractales sont des formes géométriques qui peuvent être subdivisées en plusieurs parties, dont chacune est (au moins approximativement) une copie réduite de l'ensemble. Ce sont des ensembles mathématiques avec un degré élevé de complexité géométrique qui peuvent modéliser de nombreux phénomènes naturels. Presque tous les objets naturels peuvent être observés comme fractales (les côtes, les arbres, les montagnes et les nuages). Nous introduisons quelques terminologies :



- L'analyse fractale : représente une collection de procédures mathématiques utilisées pour déterminer la dimension fractale (ou toute autre caractéristique fractale) ou un ensemble de dimensions fractales avec une erreur minimale [Dhi11].
- Monofractal : il représente un petit groupe de fractales qui disposent d'une certaine dimension fractale. Cette dimension est invariante par échelle [Dhi11].
- La dimension fractale : elle mesure le degré de fragmentation de la frontière fractale ou l'irrégularité sur plusieurs échelles. Soient  $\vec{x}$  un sous-ensemble compact de  $\mathbb{R}^{d_e}$ , avec  $d_e$  la dimension euclidienne de l'espace et  $N_\epsilon(\vec{x})$  le nombre minimal de boules de rayon  $\epsilon$  nécessaires pour recouvrir  $\vec{x}$ . La dimension fractale est définie par :  $D(\vec{x}) = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\ln(N_\epsilon(\vec{x}))}{\ln(\frac{1}{\epsilon})}$ . En fait, la dimension fractale dépasse strictement la dimension topologique. Elle est utilisée pour caractériser la texture, mais elle est insuffisante pour la discrimination [Dhi11].
- Multifractale : la plupart des fractales naturelles ont différentes dimensions fractales selon l'échelle. Elles sont composées de plusieurs fractales avec les différentes dimensions fractales. Ils sont appelés « multifractales ». Pour caractériser l'ensemble de multifractales, nous ne devrions pas établir toutes leurs dimensions fractales, il suffit d'évaluer leur dimension fractale à la même échelle [Gra03].

#### 5.2.2.2.2 Principe

Comme mentionné précédemment, presque tous les objets naturels peuvent être observés comme des fractales. Une propriété des fractales est de décrire des phénomènes naturels très complexes (par exemple, la ramification des arbres ou capillaires, de la structure fibreuse des cellules, les nuages, le cortex cérébral, etc.) par un petit ensemble de paramètres. Il est à signaler que la nature préfère toujours la solution la plus simple, même un organisme aussi complexe que la fourmière est composé d'organismes relativement simples, qui exécutent un ensemble d'instructions plus faciles.

### 5.2.2.2.3 Outil multi-fractale

Nous nous intéressons ici à l'une des transformées qui permettent de fournir des exposants de singularités qui traduisent une texture et arrivent à améliorer la qualité de l'image initiale. Des applications dans d'autres domaines (télédétection, médical) ont confirmé l'apport de cette transformée dans le renforcement de l'homogénéité locale et la séparation entre les objets. Il s'agit en effet de l'analyse multi-fractale.

L'analyse multi-fractale des images consiste à définir des mesures à partir des niveaux de gris, et à fournir une description à la fois locale et globale de l'image. Elle peut être réalisée via deux approches : en analysant soit les propriétés statistiques des données, soit les propriétés géométriques.

- L'approche statistique consiste à définir une variable dépendante d'un paramètre d'échelle, puis à analyser les moments de la distribution afin de mettre en évidence un comportement multi-échelle en loi de puissance. Cela revient essentiellement à calculer ces moments moyennant les réalisations de cette variable sur un échantillon des points du signal. La variable est dite multi-fractale si ces moments dévoilent une dépendance en loi de puissance selon le paramètre d'échelle.
- L'approche géométrique vise également à vérifier une dépendance en loi de puissance d'une certaine variable suivant un paramètre d'échelle, mais pour l'ensemble des points du signal. Cela revient à effectuer un test direct de la multifractalité en calculant les exposants de singularité en chaque point afin d'obtenir une organisation suivant une hiérarchie multi-fractale.

Nous allons décrire dans ce qui suit l'approche géométrique utilisée pour l'estimation des coefficients de singularités illustrée par la figure 5.7.

La démarche pour effectuer une analyse multi-fractale se résume essentiellement aux quatre étapes suivantes :

1. définir une mesure  $\mu$  à partir de l'image,
2. déterminer les exposants de singularité  $\alpha(\vec{x})$ ,

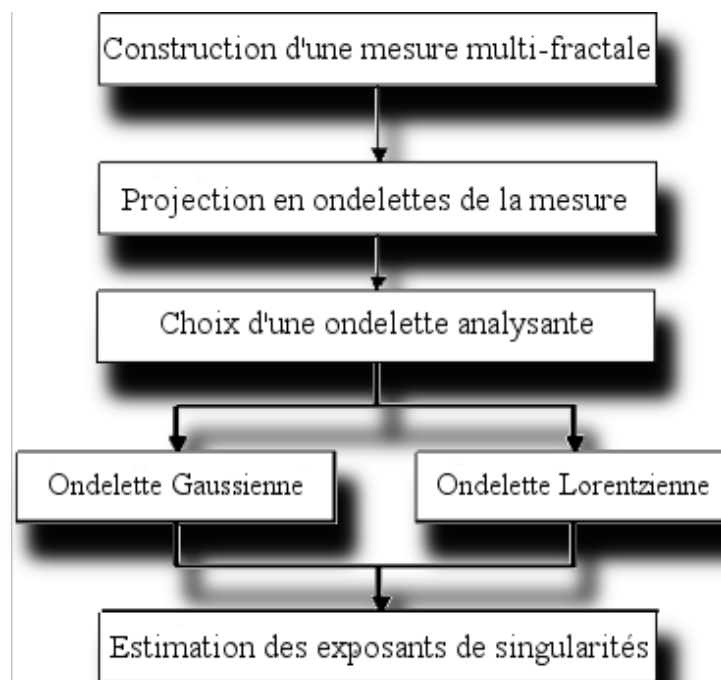


FIGURE 5.7 — Diagramme d'estimation des coefficients de singularités.

3. décomposer le signal en sous-ensemble  $E_\alpha$  ayant la même régularité,
4. mesurer la taille des sous-ensembles obtenus, ce qui revient à estimer le spectre de singularités.

Les détails de ces démarches sont reportés à l'annexe A.

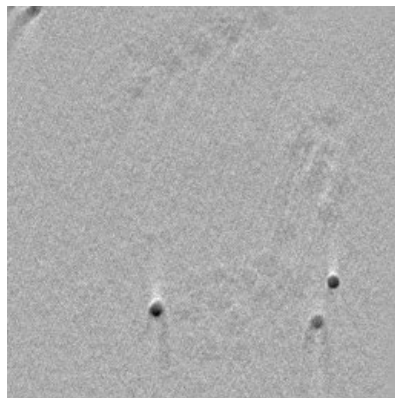
#### 5.2.2.2.4 Application

Nous avons appliqué la transformée de Hölder sur l'image tomographique. Le résultat est illustré par la figure 5.8.

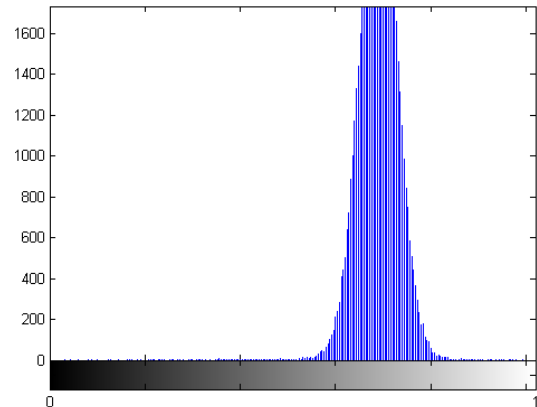
Cette figure montre une amélioration significative du contraste de l'image transformée, une qualité visuelle permettant une distinction entre le ribosome et le reste de l'image, et un histogramme étalé sur l'axe des niveaux de gris (*cf.* figure 5.8(d)).

Chaque niveau de gris de l'image transformée correspond à un exposant de singularité d'où la richesse en texture de l'image de Hölder. Des travaux ont prouvé la

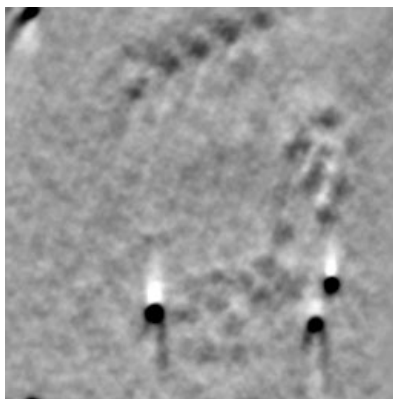
capacité de la transformée de Hölder à fournir une information de texture pertinente, particulièrement pour les images de télédétection de très haute résolution [Dhi11]. Nous confirmons à travers nos applications de l'analyse multi-fractale l'apport de cette méthode dans l'amélioration de la qualité de l'image tomographique des cellules eucaryotes.



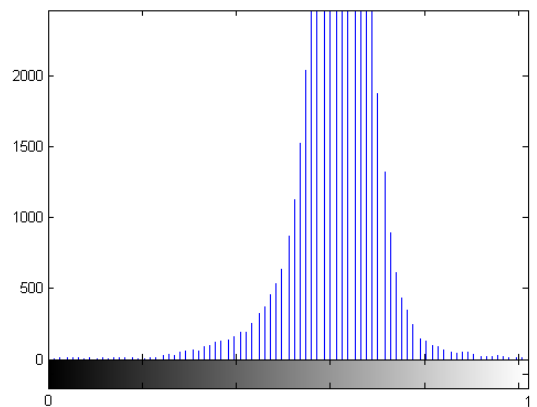
(a) image brute



(b) histogramme de l'image brute



(c) image de Hölder



(d) histogramme de 5.8(c)

**FIGURE 5.8** — Application de l'analyse multi-fractale sur l'image tomographique.

Une généralisation de cette approche pour des images 3D est abordée dans la section suivante.

### 5.2.2.2.5 Analyse multi-fractale 3D

Il s'agit ici d'appliquer l'analyse multi-fractale sur l'objet 3D. Pour réaliser cette tâche, nous commençons par introduire et appliquer une transformée en ondelette 3D.

De la même manière que la transformée en ondelette 2D a été inspirée par la transformée 1D, son application dans l'espace 3D va être inspirée de la transformée 2D.

La transformée dans l'espace 3D prend en considération le troisième axe de l'espace, alors une décomposition 1D suivant  $z$  est ajoutée suivant la modélisation présentée dans la figure 5.9.

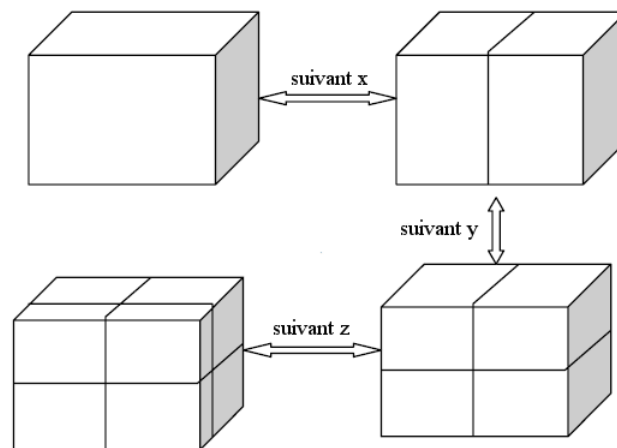
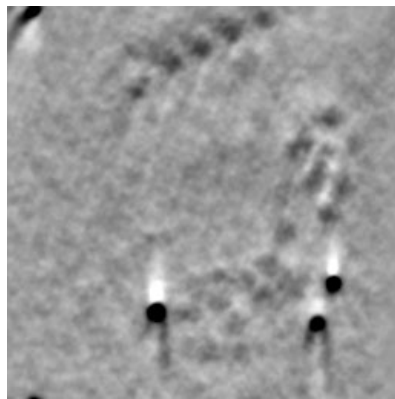
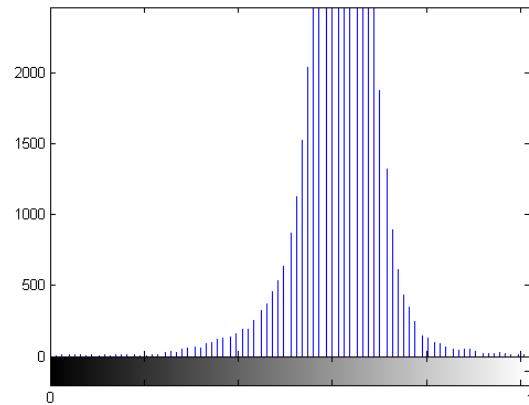


FIGURE 5.9 — Décomposition 3D d'ondelette.

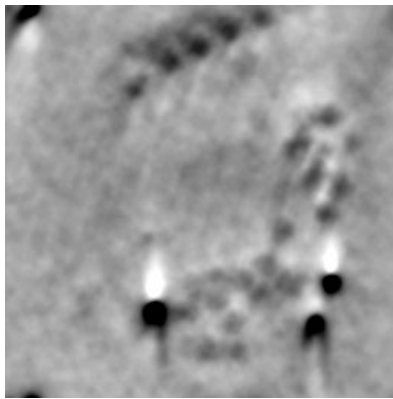
Après le calcul de la transformée d'ondelette 3D avec l'ondelette lorentzienne 3D (*cf.* figure 5.11), nous allons calculer le coefficient d'Hölder pour chaque voxel suivant les voxels qui correspondent aux mêmes coordonnées pour chaque échelle calculée.



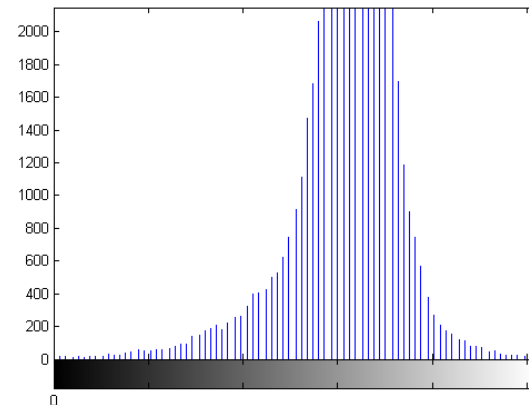
(a) image de Hölder 2D



(b) histogramme de 5.10(a)



(c) image de Hölder 3D



(d) histogramme de 5.10(c)

**FIGURE 5.10** — Application de l'analyse multi-fractale 3D sur l'image tomographique.

Le résultat de l'application de notre approche multi-fractale 3D sur notre image tomographique est illustré par la figure 5.10. L'analyse de l'histogramme de l'image Hölder d'une coupe 2D et celle de l'objet 3D révèle une meilleure distribution des niveaux de gris de l'image tomographique pour le cas 3D. Le masque 3D que nous avons introduit pour l'application de Hölder prend en considération les différentes coupes de l'objet 3D reconstruit et arrive à renforcer l'homogénéité locale et lisser les structures dégagées. Une comparaison de l'image 5.10(a) et 5.10(c) explique cette amélioration et caractérise l'image 3D avec un contraste meilleur, que celui

obtenu avec les coupes 2D.

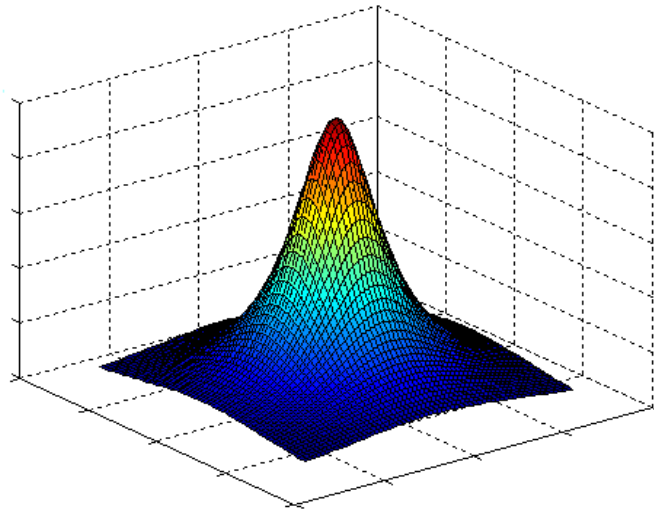


FIGURE 5.11 — Allure de l'ondelette lorentzienne 3D.

## 5.2.3 Tests

### 5.2.3.1 Synthèse des résultats de deux méthodes

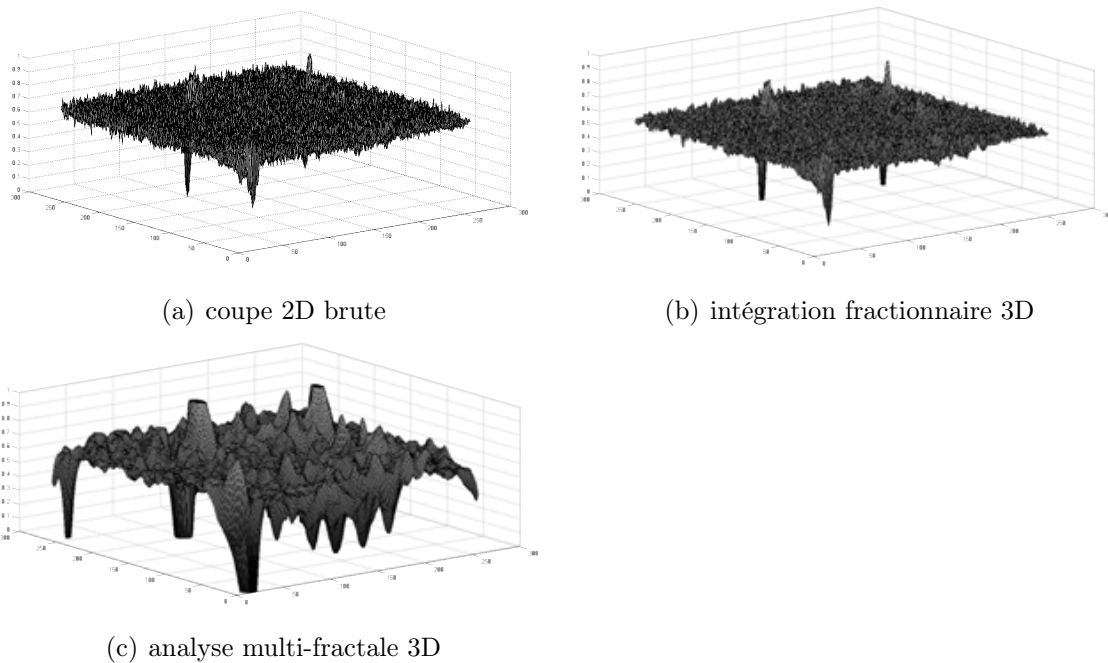
Le premier obstacle pour la segmentation des images tomographiques des cellules eucaryotes est la qualité des données du MET qui se traduit par des coupes 2D de faible contraste et fortement bruitées. Les algorithmes usuels de filtrage n'arrivent pas à améliorer les données tomographiques, c'est l'une des raisons qui nous ont amené à recourir à des transformations qui renforcent l'homogénéité locale et aboutir à des données images mieux contrastées pour faciliter l'interprétation et permettre des analyses plus fines en matière de segmentation.

Les deux méthodes que nous avons introduites ont permis d'améliorer la qualité de l'image tomographique initiale. Toutefois il importe d'évaluer chacune de ces méthodes afin de conclure sur leur apport respectif et retenir celle qui s'adapte le mieux pour la segmentation tomographique.

Les figures 5.6 et 5.10 illustrent les résultats obtenus à travers l'application

de l'intégration 3D et l'analyse multi-fractale 3D. L'analyse de contraste est à l'avantage de multi-fractale, l'image de Hölder 3D se distingue en effet par une distribution des niveaux de gris qui permet de localiser facilement les traces du ribosome avec des composants en niveaux de gris spécifiques.

La figure 5.12 illustre les cartes topographiques des distributions des niveaux de gris pour l'image brute, l'image d'intégration fractionnaire 3D et celle de l'analyse multifractale 3D. Cette dernière explique l'apport de l'analyse multi-fractale dans l'amélioration de l'homogénéité locale et une meilleure distribution des niveaux de gris.



**FIGURE 5.12** — Carte topographique de l'image tomographique avant et après filtrage.

### 5.2.3.2 Évaluation

Pour l'évaluation numérique des deux approches que nous avons introduites pour le débruitage et le renforcement de l'homogénéité locale, nous avons généré des images de synthèse contenant un bruit mixte Poisson-gaussien. Ainsi, nous



considérons un modèle de bruit mixte Poisson-gaussien de la forme [ZFSOM07] :

$$y = \zeta z + b \text{ avec } \begin{cases} z \sim \mathcal{P}(\frac{x}{\zeta}) \\ b \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2) \end{cases} \quad (5.11)$$

où  $z$  et  $b$  sont deux variables aléatoires indépendantes, qui suivent respectivement une distribution de Poisson et une distribution gaussienne. Ce modèle de bruit introduit deux paramètres numériques :

- $\sigma \geq 0$  est l'écart-type de  $b$  ; plus ce paramètre est élevé, plus le modèle (5.11) se comporte comme un modèle de bruit gaussien pur.
- $\zeta \geq 0$  est le gain du processus d'acquisition<sup>1</sup> ; plus ce paramètre est élevé, plus le bruit dans le modèle (5.11) suit le comportement de Poisson.

La figure 5.13 présente une des images de test ( Shepp-Logan) qui est bruitée ( $y$ ) avec le modèle du bruit mixte Poisson-gaussien, pour différentes valeurs des paramètres  $\sigma$  et  $\zeta$ . Dans la figure 5.13, l'image en haut à gauche obtenue avec  $\sigma = 0,1$  et  $\zeta = 0$ , est l'image la plus proche de la vérité du terrain ( $x$ ) (à savoir l'image d'origine Shepp-Logan). Toutes les images de test sont bruitées avec les deux paramètres  $\sigma \in [0,1 \ 0,5]$  et  $\zeta \in [0 \ 1]$ .

Pour évaluer les performances de la méthode d'intégration, nous avons utilisé le PSNR comme critère de performance.

---

1. Par convention, lorsque  $\zeta = 0$ , le modèle (5.11) doit être comprise comme  $y = x + b$  (à savoir le bruit gaussien pur). Cette extension est motivée par le fait que la variable aléatoire  $\zeta z$  avec  $z \sim \mathcal{P}(\frac{x}{\zeta})$  converge vers  $x$  (la valeur déterministe) lorsque  $\zeta \rightarrow 0$ .

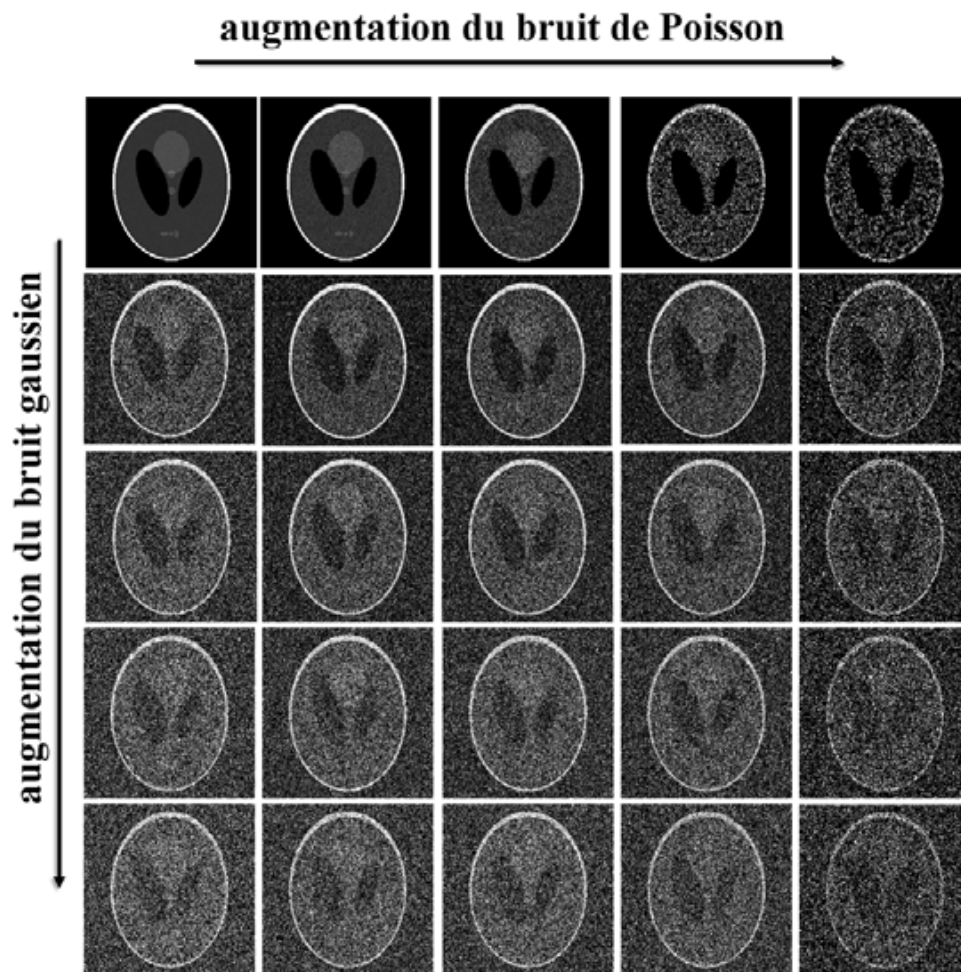



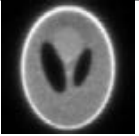






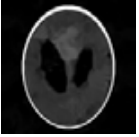
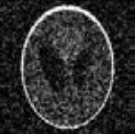




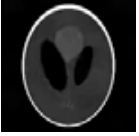



FIGURE 5.13 — Protocole d'ajout du bruit.

Nous présentons dans le tableau 5.1 et la figure 5.14 le résultat de l'application des deux méthodes introduites (l'intégration fractionnaire et l'analyse multifractale) et d'autres méthodes existantes (BM3D et le filtre médian). L'axe des abscisses pour les figures 5.14 et 5.15 représente les niveaux de bruit des images de test (25 cas selon l'équation (5.11)) :

- 1 à 5 : degrés de bruit gaussien pur,
- 6 à 20 : degrés de bruit Poisson-gaussien mixte,
- 21 à 25 : degrés de bruit Poisson pur.

TABLE 5.1 — Débruitage des images avec différentes approches

	bruité	int_chen	int_moy	holder	BM3D	median
poisson						
gaussien						
mixte						

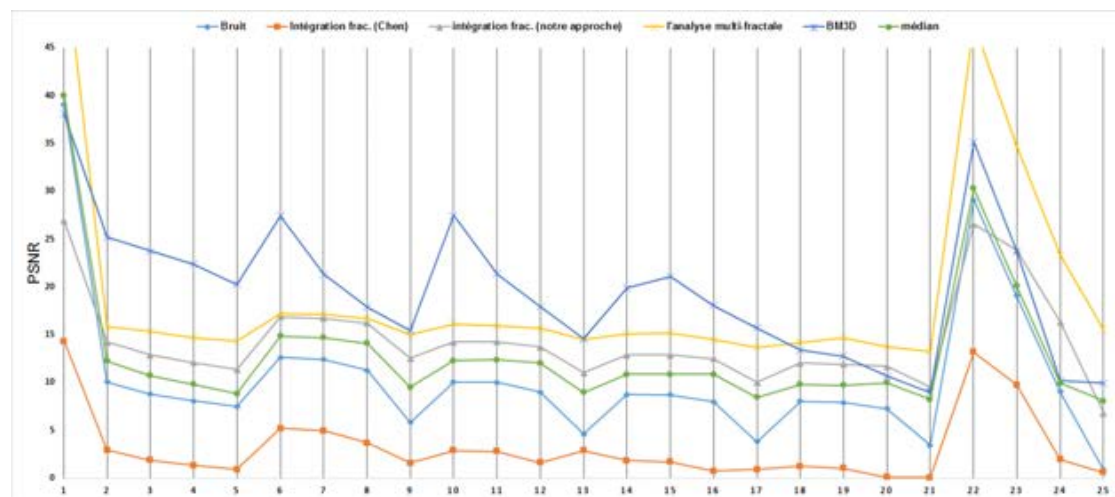
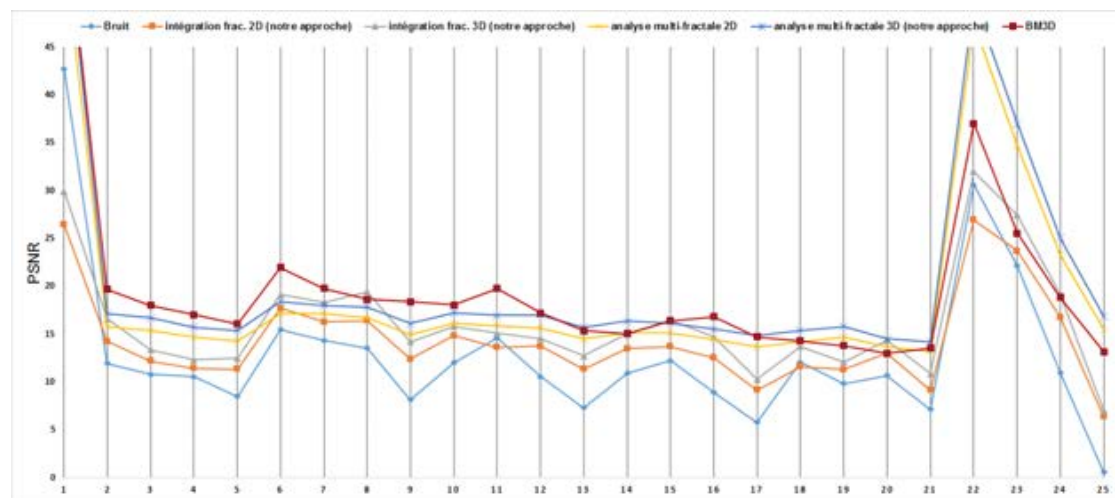


FIGURE 5.14 — Performance des différentes approches contre le bruit mixte Poisson-gaussien en cas 2D.



**FIGURE 5.15** — Performance des différentes approches contre le bruit mixte Poisson-gaussien en cas 3D.

La figure 5.14 décrit la variation de PSNR en fonction du niveau du bruit inclus. Ainsi, sur les coupes 2D, la méthode BM3D donne les meilleurs résultats lorsque le bruit gaussien domine. Par contre, pour un bruit majoritairement de Poisson, l'analyse multi-fractale donne de meilleurs résultats. Dans tous les cas, l'intégration fractionnaire obtient des résultats moins bons que BM3D et l'analyse multi-fractale.

La figure 5.15 illustre le résultat de l'intégration fractionnaire et l'analyse multi-fractale pour le cas 2D et 3D des images synthèses, le meilleur score est obtenu pour l'analyse multi-fractale 3D lorsque le bruit de Poisson domine.

### 5.3 Classification de l'image reconstruite

La segmentation de l'image tomographique des cellules eucaryotes a comme objectif d'extraire les ribosomes et fournir une cartographie sur leurs formes et structures. L'approche que nous préconisons pour l'extraction des ribosomes s'appuie sur une classification supervisée faisant intervenir des zones d'apprentissages

pour chacune des classes introduites.

### 5.3.1 Définition des classes

Les classes que nous avons définies pour la classification de l'image tomographique correspondent, comme déjà précisé dans la section 5.1, aux ribosomes, au solvant et aux particules d'or. Pour chacune de ces classes, nous avons défini des zones d'apprentissage afin de les caractériser. La localisation de ces zones a fait l'objet d'un travail d'expert du domaine biologique. La figure 5.16 illustre un marquage de ribosomes dans l'une des coupes de l'image tomographique 3D.

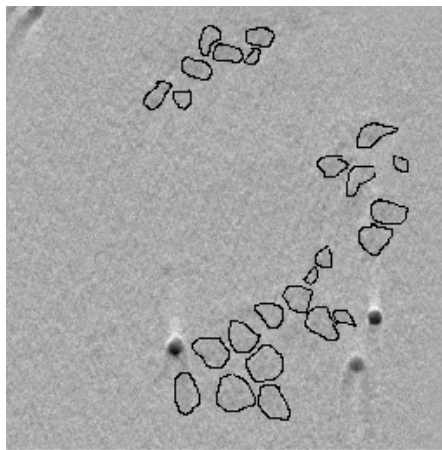


FIGURE 5.16 — Zone d'apprentissage du ribosome.

La classe des particules d'or est représentée par des niveaux de gris très faibles et ne pose pas de problème pour leur distinction. Cependant, la classe de solvant occupe le reste de l'image, une forte confusion apparaît avec la classe de ribosome.

### 5.3.2 Choix du classifieur

Plusieurs travaux de segmentation et de classification d'images tomographiques utilisent des méthodes de seuillage pour la caractérisation des classes. Ces méthodes offrent un bon résultat lorsque l'image est bien contrastée et que les classes

étudiées ne posent pas des problèmes de confusion. Comme ce n'est pas le cas des images des cellules eucaryotes, nous avons écarté ces méthodes et orienté notre intérêt vers des approches qui s'accommodent de la qualité des images sur lesquelles nous travaillons. Des études récentes [Dhi11] ont montré l'efficacité des techniques issues de la théorie de décision à gérer les problèmes de classification. Ces techniques formalisent le problème de classification avec des modèles probabilistes, markoviens ou de croyance. Ce dernier modèle est utilisé dans un contexte multi-sources où on dispose d'une multitude de sources d'information pour la zone étudiée. Dans le cadre probabiliste markovien, l'image est considérée comme une réalisation d'un champ aléatoire  $X = (X_s, X_t, \dots)$ . Les probabilités conditionnelles locales d'une valeur en un site  $s$  rendent possible la mesure du lien statistique entre l'image et un descripteur  $x_s$  qui lui appartient. Ainsi, le champ aléatoire est dit markovien si et seulement si le descripteur en un site ne dépend que de ses sites voisins [Bes86]. Pour segmenter une image avec les champs markoviens, nous nous plaçons dans le cadre bayésien, où l'image est modélisée par deux champs aléatoires qui sont :

- $X = (X_s)_{s \in \mathcal{S}}$ , le champ d'étiquette, ou un site donné  $s$ ,  $x_s = l$ ,  $0 \leq l < L$  qui indique le label de ce site, où  $L$  est le nombre de classes dans l'image.
- $Y = (Y_s)_{s \in \mathcal{S}}$ , le champ des observations, dans ce cas il peut prendre les valeurs des niveaux de gris.

L'objectif est d'estimer les valeurs du champ d'étiquette inobservables à partir de l'observation. Le cadre bayésien présente plusieurs estimateurs dans ce contexte, comme, par exemple, l'estimateur MAP (maximum de vraisemblance a posteriori), MPM (maximum a posteriori de la marginale) et TPM (Threshold Posteriori Mean) [ST99].

Plusieurs champs de Markov existent, nous citons ici le modèle Potts. Le modèle Potts [Wu82] (une généralisation du modèle Ising) est souvent utilisé dans les problèmes de segmentation. Ce champ est défini par leur voisinage et leur fonction d'énergie. Le voisinage dans ce modèle est constitué par les 4 ou 8 plus proches voisins et la fonction d'énergie global est définie par :

$$U(X) = -\beta \sum_{i \sim j} \delta(x_i - x_j) \quad (5.12)$$

où  $\delta(\cdot)$  est la fonction de dirac et  $\beta$  est le paramètre de modèle. Le choix de  $\beta$  et le type d'image affectent la qualité de segmentation. Ce modèle est insatisfaisant en termes de régularisation à cause de son comportement complexe trop dépendant de la valeur de son paramètre  $\beta$  [MDZ96].

Comme nous disposons d'une seule source (l'image tomographique) et le type de cette image affecte la performance du modèle de Markov, nous avons donc retenu le modèle probabiliste pour mettre en œuvre notre classifieur.

Les méthodes probabilistes sont fondées sur une base théorique et ont été l'objet de nombreux travaux de recherche. Elles offrent donc des outils très riches permettant la modélisation et aussi l'apprentissage des modèles. De plus, elles proposent des règles d'usage soit théoriques soit heuristiques. La modélisation probabiliste est un concept partagé qui sert naturellement de base de comparaison aux autres modélisations [Blo94].

### 5.3.3 Classifieur probabiliste

#### 5.3.3.1 Modèle bayésien

On appelle inférence bayésienne la démarche logique permettant de calculer ou réviser la probabilité d'une hypothèse. Cette démarche est régie par l'utilisation de règles strictes de combinaison des probabilités, desquelles dérive le théorème de Bayes.

Nous considérerons dans la suite que nous disposons d'une fonction de l'observation  $x$  notée  $f_o(x)$  (pour le cas d'une image la fonction présente le niveau de gris du pixel  $x$ ). L'observation  $x$  doit avoir une décision d'un ensemble de  $n$  décisions possible  $(d_1, \dots, d_i, \dots, d_n)$ . Par exemple, la décision  $d_i$ , correspond au fait que l'hypothèse  $H_i$  a été vérifiée par l'observation  $x$ , ou encore dans le cadre de la classification l'observation  $x$  appartient à la classe  $C_i$ . La décision finale d'ap-

partenance d'observation  $x$  à une classe sera prise à partir de la combinaison des informations  $M_i(x)$  rassemblées dans le tableau  $M(x)$  donnée par :

$$M(x) = \left[ \begin{array}{cccc} M_1(x) & \dots & M_i(x) & \dots & M_n(x) \end{array} \right] \quad (5.13)$$

La théorie des probabilités est souvent associée à la théorie bayésienne de la décision. L'information  $y$  est modélisée par une probabilité conditionnelle (*e.g.* pour un pixel donné, la probabilité est définie par le taux d'appartenance de ce pixel à une classe particulière). Ce qui peut être écrit  $M_i = P(d_i|f_o)$  ou encore pour un problème de classification particulier  $M_i^j = p(x \in C_i|f_j(x))$  [Blo94].

La distribution de probabilité  $P(\cdot|f_o)$ , pour chaque hypothèse  $H_i$  correspondant à  $d_i$  (la décision  $d_i$  correspond au fait que l'observation  $x$  vérifie une hypothèse  $H_i$ ) selon la source d'information considérée (*i.e.* l'image), peut être décrite par l'application correspondant à :

$$P(\cdot|f_o) : \begin{array}{l} \Omega \rightarrow [0, 1] \\ H_i \rightarrow p(H_i|f_o) \end{array} \quad (5.14)$$

L'étape de modélisation est ainsi fondée sur les probabilités conditionnelles. Dans cette approche probabiliste, nous sommes forcés d'avoir des décisions exclusives et exhaustives. Dans le cas de la classification, ceci signifie que si  $x \in C_i$  alors  $x \notin C_k, \forall k \neq i$ , et que toutes les classes sont connues d'avance (hypothèse du monde fermé) [Sme98].

Pour l'estimation de ces distributions de probabilités, deux cas se présentent : un cas discret et un cas continu. L'estimation dans le cas discret est généralement effectuée par l'application de la formule de Bayes, ce qui revient à estimer  $P(f_o|H_i)$  par dénombrement *i.e.* à l'aide des fréquences sur une base d'apprentissage. Les distributions  $P(H_i|f_j)$  sont rarement connues en traitement de signal et des images, d'où les probabilités conditionnelles ( $P(f_o(x)|x \in C_i)$ ) sont apprises par dénombrement sur des zones de test [Sme98].

Dans le cas continu, il faut chercher à approcher les distributions  $P(H_i|f_o)$  par des distributions connues. Les distributions gaussiennes sont couramment em-



ployées [Sme98].

La méthode bayésienne appliquée pour l'agrégation de l'avis de plusieurs experts suppose que l'analyste qui recueille les opinions des experts possède lui-même une opinion sur la valeur du paramètre  $x$ . Cette opinion étant représentée par une distribution de probabilité. Les valeurs précises fournies par les experts sont alors utilisées pour mettre à jour l'opinion de l'analyste. La fiabilité des experts est capturée à l'aide de fonctions de vraisemblance, à savoir les probabilités conditionnelles  $P_i(x_i|x_{vrai})$  pour que l'expert  $E_i$  fournisse la valeur  $x = x_i$  sachant que la vraie valeur de  $x$  est  $x_{vrai}$ . Connaissant  $P(x)$  et  $P_i(x_i|x)$  on peut appliquer le théorème de Bayes pour calculer la probabilité a posteriori. Si les experts ne sont pas indépendants, on utilise directement une distribution jointe  $P(x_1, \dots, x_n|x)$  au travers de coefficients de corrélation [Blo94, Sme98].

### 5.3.3.2 Estimation de la fonction de probabilité

L'estimation de la fonction de probabilité découle de l'analyse de l'histogramme de la zone d'apprentissage. La normalisation de l'histogramme permet de retenir une probabilité maximale pour le niveau de gris ayant la fréquence maximale, et une probabilité nulle pour les niveaux absents de la zone d'apprentissage de la classe.

Les niveaux correspondants à des fréquences intermédiaires seront caractérisés par une probabilité déduite de l'histogramme normalisé. La figure 5.17 illustre l'estimation de la fonction de probabilité dans l'image.

## 5.4 Application sur l'image brute

Un exemple d'échantillonnage des classes d'intérêt est présenté dans la figure 5.18. Les zones bleus présentent la classe « particules d'or », Les zones rouges correspondent à « solvant » et les zones vertes à la classe « ribosome ».

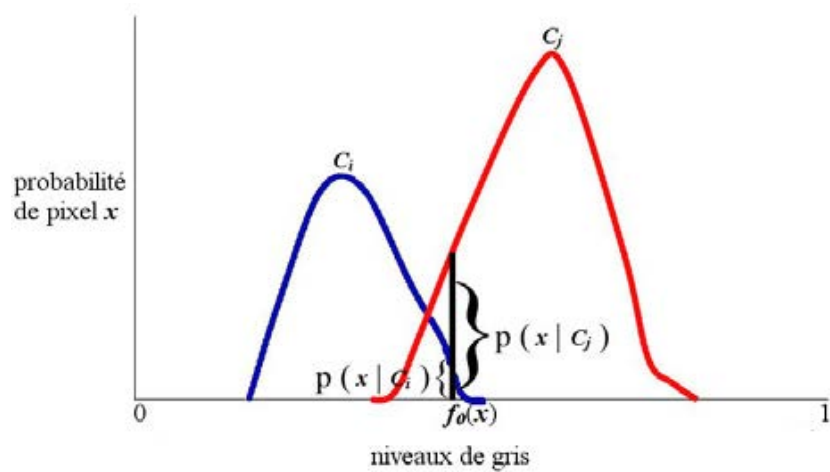


FIGURE 5.17 — La probabilité de l'observation  $x$  pour chaque classe  $C_i$ .

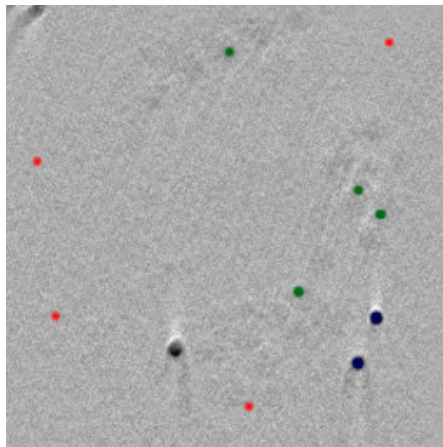


FIGURE 5.18 — Zones d'apprentissage de l'image brute.

La figure.5.19 illustre la confusion entre les zones d'apprentissage des classes. En effet, on remarque que les histogrammes des classes ribosome et solvant ont une large surface confondue, ce qui explique le résultat du classifieur dans la décision d'affectation qui s'est trouvée souvent confondue et répartie entre les deux classes.

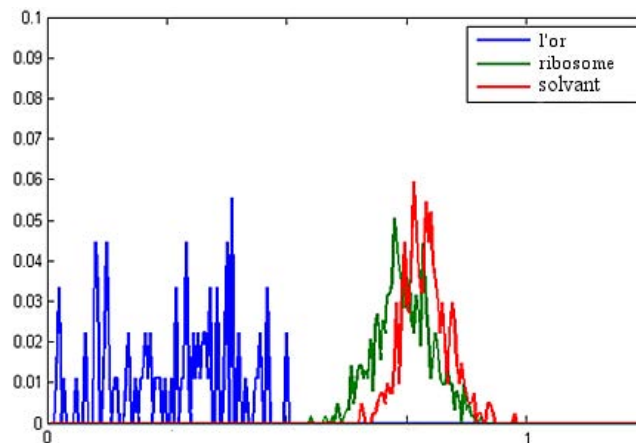


FIGURE 5.19 — Histogramme des zones d'apprentissage des classes de la figure.5.18.

## 5.5 Classification sur l'image tomographique

Nous présentons dans cette section le résultat de notre classifieur appliqué sur l'image tomographique avant et après transformation afin d'évaluer l'apport des transformations appliquées et de retenir la meilleure approche pour l'extraction des ribosomes dans l'image.

### 5.5.1 Classification brute

Le classifieur appliqué sur l'image tomographique se base sur le formalisme des fonctions de probabilité. Les points de l'image ont été affectés sur la base des fonctions de probabilité estimées pour chacune des classes. La figure 5.20 illustre une coupe 2D de l'objet reconstruit et le résultat de sa classification.

L'analyse du résultat dégagé par le classifieur illustre une confusion entre les deux classes ribosome et solvant. Cette confusion empêche l'extraction du contenu de l'image porteur d'information (ribosome) et ne permet pas de résoudre l'ambiguïté entre ces deux classes.

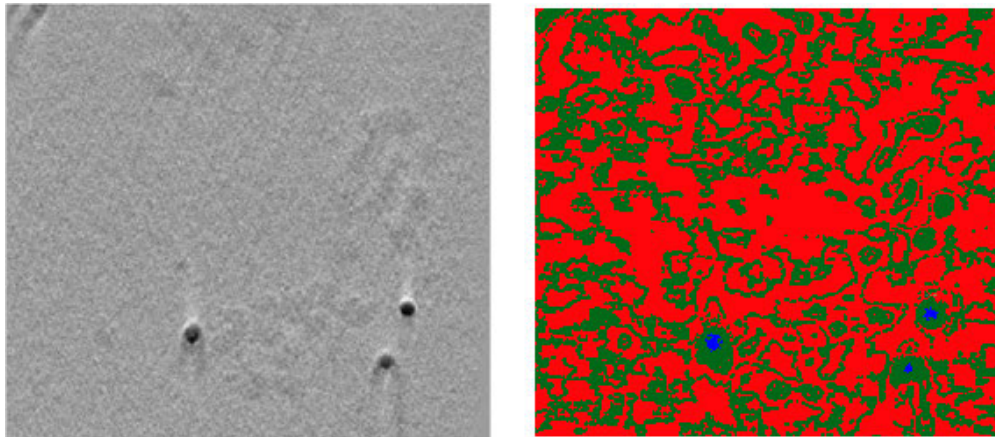


FIGURE 5.20 — Classification d'une coupe 2D de l'objet reconstruit.

Ceci s'explique par la distribution des niveaux de gris des zones d'apprentissage et par le faible contraste entre le ribosome et le solvant dans les composantes 2D reconstruites (ainsi que dans l'image initiale).

### 5.5.2 Classification avec l'intégration fractionnaire

Notre classifieur probabiliste a été appliqué sur l'image transformée avec l'intégration fractionnaire et les résultats sont meilleurs que ceux de l'image tomographique initiale. La figure 5.21 montre l'histogramme des classes des zones d'apprentissage issues de l'intégration fractionnaire.

Nous remarquons une résolution partielle de la confusion entre les deux classes ribosome et solvant à travers une surface d'intersection entre les deux classes les plus réduites.

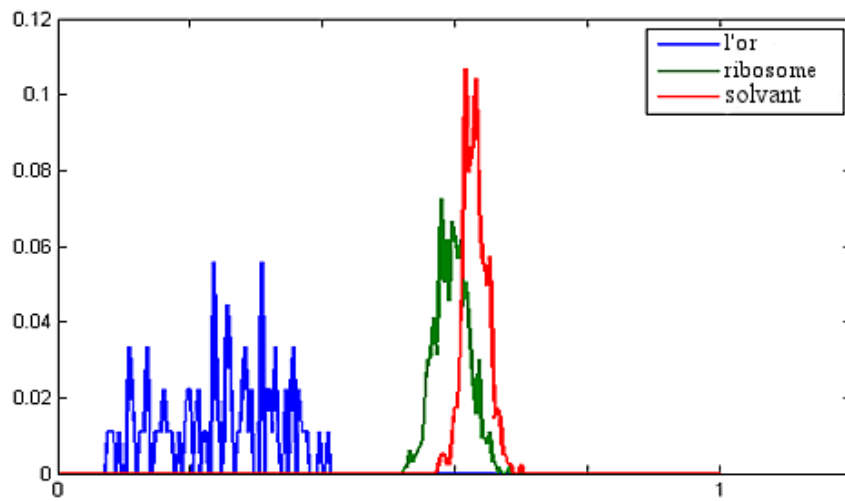


FIGURE 5.21 — Histogramme des zones d'apprentissage des classes après l'intégration.

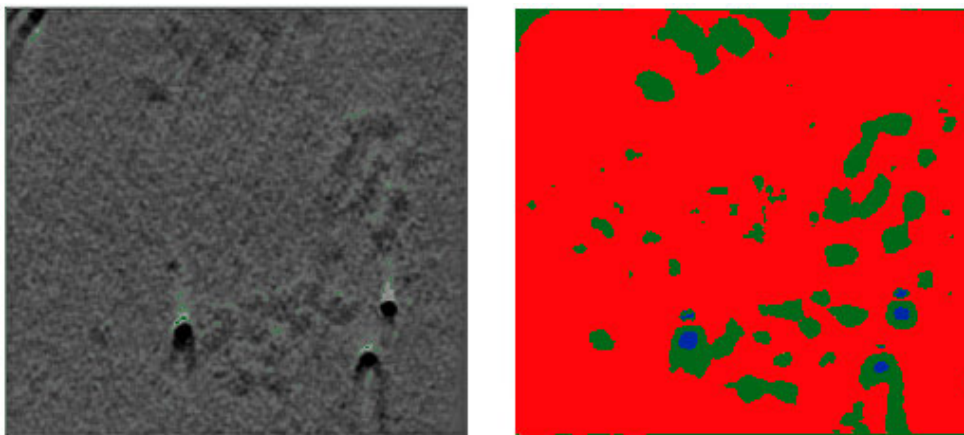


FIGURE 5.22 — Filtrage de la coupe 2D par l'intégration fractionnaire et sa classification.

### 5.5.3 Classification avec l'analyse multifractale

Une première analyse visuelle révèle une meilleure qualité de l'image apportée par Hölder. La séparation entre les deux classes ribosome et solvant est améliorée et ceci se confirme par l'application de notre classifieur probabiliste et l'analyse de

l'histogramme des zones d'apprentissage issues de l'image Hölder (*cf.* figure 5.23).

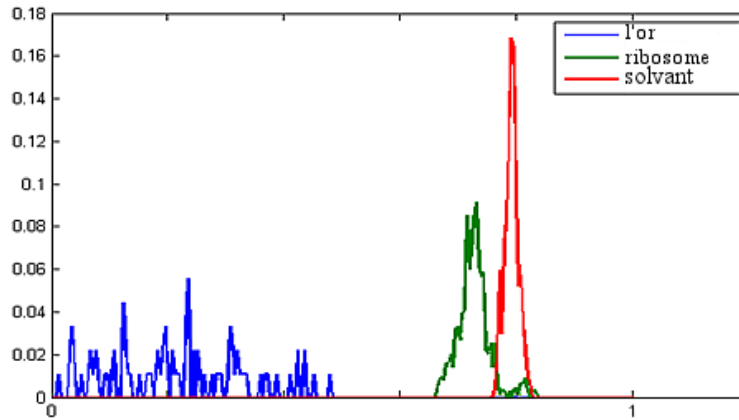


FIGURE 5.23 — Histogramme des zones d'apprentissage des classes après l'analyse multi-fractale.

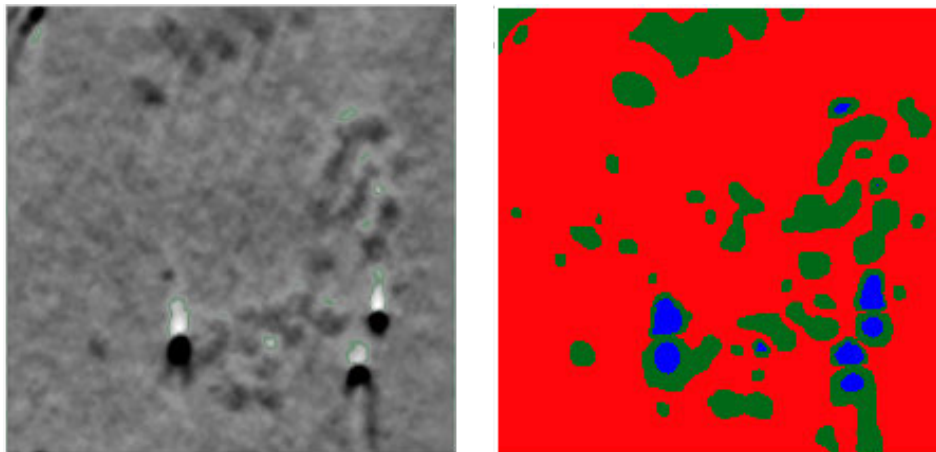


FIGURE 5.24 — Filtrage de la coupe 2D par l'analyse multi-fractale et sa classification.

## 5.6 Extraction du ribosome du volume 3D

### 5.6.1 Approche

Nous présentons dans cette section notre approche d'extraction des ribosomes du volume 3D reconstruit. Il s'agit d'une classification supervisée qui s'appuie sur des zones d'apprentissage extraites de l'image 3D. Ces zones correspondent à des régions délimitées par un expert et qui vont servir à caractériser la classe du ribosome dans l'image tomographique.

Étant donné les résultats obtenus et évalués dans la section précédente et qui ont apporté la distinction de l'analyse multi-fractale par rapport aux autres méthodes expérimentées et son apport significatif dans l'amélioration de la qualité des données de l'image tomographique des cellules eucaryotes, nous l'avons adopté comme source d'information pour notre classifieur.

En effet, l'application de l'analyse multi-fractale 3D sur l'image tomographique donne un aspect plus général que l'information spectrale pour chaque voxel de l'image 3D. Les exposants de singularité d'Hölder incluent des informations pour plusieurs échelles fournies par la transformée d'ondelette.

Ces informations présentent une vue locale et globale sur le voxel et son voisinage. Avec la considération de la troisième dimension, nous allons donc profiter d'une information 3D incluant une vue locale et globale de l'analyse multi-fractale.

La figure 5.25 récapitule l'enchaînement de l'ensemble des étapes qui aboutissent à l'extraction du ribosome du volume 3D.

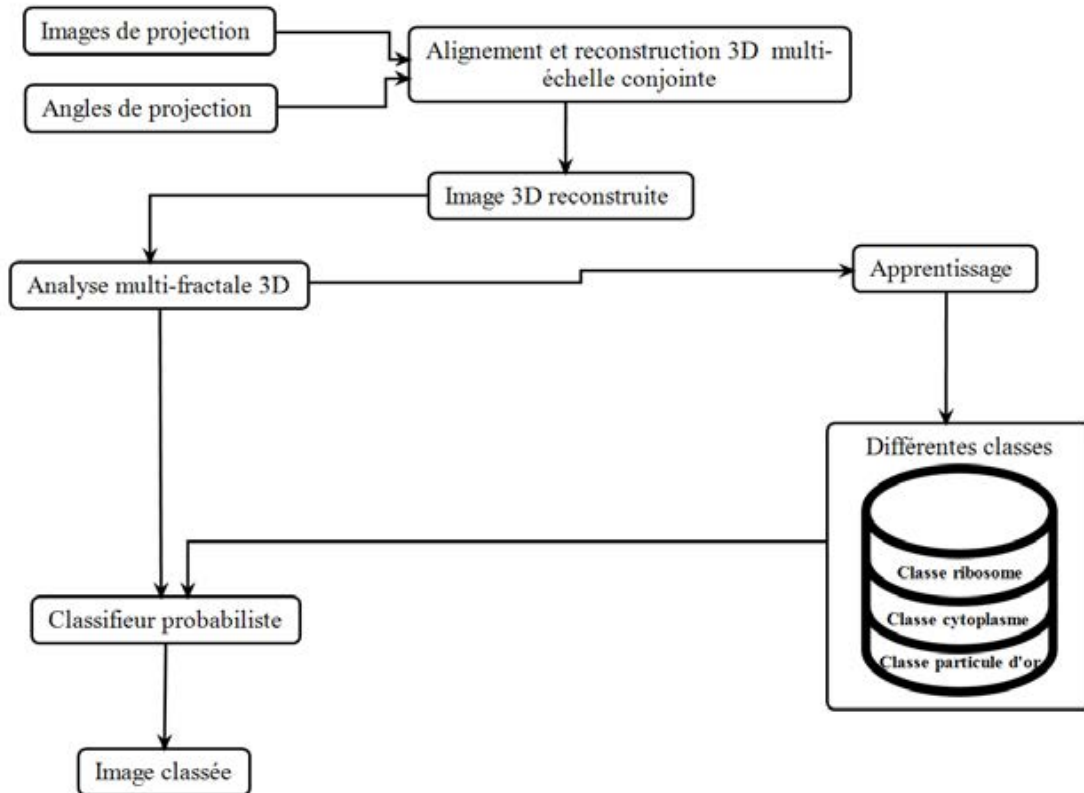


FIGURE 5.25 — Architecture de notre système de reconstruction et classification 3D

### 5.6.2 Évaluation

Afin d'évaluer la performance d'un système de classification, il est nécessaire de définir des critères permettant d'estimer ces résultats. Dans notre cas nous nous intéressons plus à l'aspect qualitatif du résultat. Nous retenons les deux mesures les plus utilisées dans la littérature qui sont : le rappel et la précision.

Le rappel représente le nombre d'individus correctement détectés par rapport à l'ensemble des individus qui ont réellement existé dans la population. Pour notre cas, un individu désigne un ribosome. Cette mesure permet donc de mesurer la capacité de notre approche à restituer l'ensemble des objets pertinents.



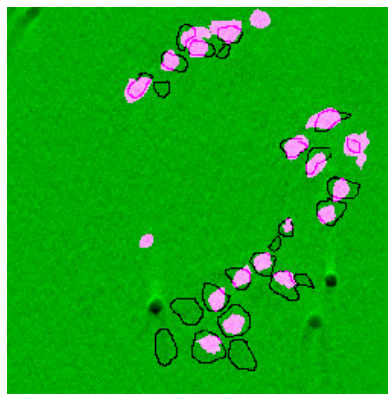
Le rappel est calculé par la formule suivante :

$$\text{rappel} = \frac{\text{Nombre d'objets correctement identifiés}}{\text{Nombre d'objets pertinents dans l'image}} \quad (5.15)$$

La précision représente le nombre d'objets correctement identifiés par rapport au nombre d'objets identifiés. Elle permet d'évaluer la capacité du système à ne restituer que des objets pertinents. La précision est calculée par la formule suivante :

$$\text{précision} = \frac{\text{Nombre d'objets correctement identifiés}}{\text{Nombre d'objets identifiés}} \quad (5.16)$$

La figure 5.27 présente les différentes vues de l'image 3D des ribosomes extraits. Une analyse visuelle permet de constater que l'extraction des ribosomes a été établie de manière assez fidèle par rapport au contenu de l'image 3D. La superposition d'une des coupes 2D de l'image résultante avec une carte de référence fournie par un expert confirme cette constatation (*cf.* figure 5.26). Cette figure illustre que la plupart des composants ribosomes ont été identifiés.



**FIGURE 5.26** — Superposition d'une coupe de l'image des ribosomes avec le masque donné par l'expert.

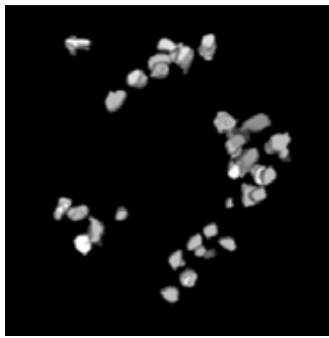
**TABLE 5.2** — Évaluation du rappel et de la précision.

	notre système	notre alig-rec conjointe et Multi-seuillage	SIRT suivie par AMF 3D et class. prob.	SIRT et Multi- seuillage
rappel	77%	84%	62%	67%
précision	92%	48%	79%	28%

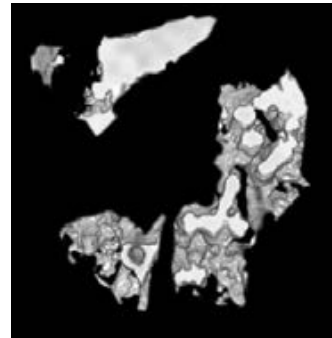
Le tableau 5.6.2 illustre une évaluation numérique de notre approche faisant intervenir les deux critères : rappel et précision, aussi une comparaison avec une approche de classification utilisant un seuillage multiple [BS08] sur une image reconstruite par notre méthode et sur une image reconstruite par SIRT et finalement une évaluation sur la fiabilité de notre filtrage et classification sur une image reconstruite par la méthode SIRT.

Le taux d'extraction est légèrement inférieur à celui de la méthode de multiseuillage, par contre notre précision dépasse de loin celle de l'approche [BS08], 92% pour notre approche contre 48% pour [BS08]. Ainsi, notre approche de filtrage et extraction fonctionne bien même avec une image reconstruite par SIRT directement, mais notre approche de reconstruction conjointe aide à améliorer le taux d'extraction.

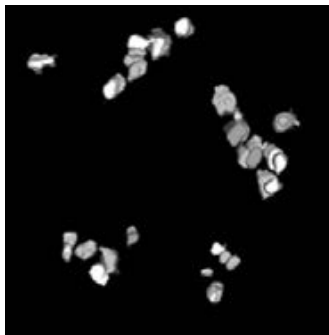
Nous avons appliqué notre classifieur conformément à l'architecture exposée dans la figure 5.25. La figure 5.27 présente quelques coupes des résultats obtenus et donnés dans le tableau .



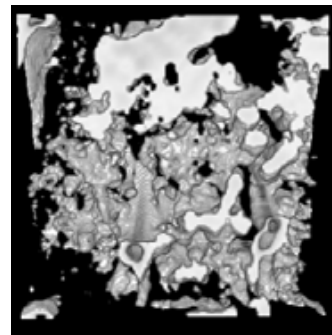
(a) notre système d'extraction 3D globale



(b) notre alignement conjointe suivie par Multi-seuillage



(c) SIRT suivie par AMF 3D et class. prob.



(d) SIRT suivie par Multi-seuillage

**FIGURE 5.27** — Extraction de ribosomes de l'objet 3D à partir de l'image reconstruite.

## Conclusion

Nous avons introduit dans ce chapitre une approche d'extraction des ribosomes de l'image tomographique. Cette extraction est basée sur un système qui intègre une phase d'application de transformée sur les données intitulées et une phase de classification supervisée s'appuyant sur des zones d'apprentissage pour le ribosome. Nous avons montré l'efficacité de l'analyse multi-fractale et son apport dans l'amélioration de la qualité de l'image et l'homogénéité locale. L'image transformée étant utilisée comme entrée pour notre classifieur probabiliste. Les résultats

obtenus pour l'extraction des ribosomes à partir de l'image 3D soutiennent les choix retenus et la capacité de l'approche proposée à dégager une information sur le ribosome contenu dans le volume 3D.

---

# Conclusion et Perspectives

Nous avons été amenés dans le cadre de ce travail à étudier les principaux problèmes posés par les images tomographiques et particulièrement ceux qui se rattachent aux images biologiques acquises par des microscopes électroniques en transmission. Ces problèmes se situent à deux niveaux, à savoir, la reconstruction et l'extraction d'information.

Plusieurs méthodes de reconstruction tridimensionnelles existent. Celles qui sont utilisées dans le domaine de la cryo-tomographie électronique reposent sur une phase de prétraitement qui sert à aligner les images de projections par rapport à un axe commun. Cet alignement permet de corriger les erreurs des transformations géométriques survenues dans l'espace 3D en effectuant un recadrage entre les images de projections.

Toutefois, la séparation de ces deux phases de traitement (alignement, reconstruction) entraîne une propagation des erreurs résiduelles de la phase d'alignement. De plus, l'estimation des erreurs 3D à partir des images de projections 2D ne permet pas de gérer le problème dans un contexte tridimensionnel. Ceci nous a conduit à proposer une approche de reconstruction 3D où les deux phases d'alignement et de reconstruction sont fusionnées.

A cet effet, nous avons introduit une fonction de coût tridimensionnelle qui traite d'une manière simultanée les corrections géométriques d'acquisition et l'amélioration de l'objet reconstruit basé sur l'algorithme du gradient conjugué. L'avan-

tage de cette contribution est de corriger les transformations géométriques dans l'espace 3D où ces mouvements ont eu lieu. En effet, l'utilisation des transformations géométriques 3D, à la place des transformations 2D habituellement utilisées, nous donne plus de contrôle sur la procédure d'optimisation et plus de détails sur les changements suivant les trois axes de repères et les angles de rotations qui leur correspondent. Pour accélérer cette optimisation, un schéma multi-échelle a été proposé et appliqué à l'aide d'une transformée en ondelettes.

Dans la partie d'extraction d'information de l'image tomographique reconstruite, et pour le cas particulier des images de cryo-tomographie, un problème à prévoir dans le processus de segmentation est la faible qualité de l'image et la difficulté de distinguer les régions d'intérêt. Les méthodes classiques d'amélioration de contraste, de débruitage ne permettant pas d'obtenir un résultat satisfaisant, nous avons été amenés à étudier les différentes transformées avant d'introduire l'approche multi-fractale comme technique de transformation et d'utiliser pour améliorer la qualité de l'image brute. L'image résultant de l'analyse multi-fractale est utilisée dans la phase de classification pour identifier les ribosomes.

L'enchaînement de l'ensemble des étapes précédemment définies et son application sur les images biologiques nous a permis d'évaluer la pertinence de notre approche. En effet, les expérimentations réalisées ont montré que le raffinement tri-dimensionnel conjoint de l'alignement et de la reconstruction a permis de minimiser l'effet des erreurs des transformations géométriques qui incluent l'incertitude des angles d'inclinaison et a amélioré la qualité de la reconstruction. Ainsi, le processus 3D proposé pour gérer le filtrage du bruit de l'image tomographique reconstruite a prouvé son efficacité. Ceci a été illustré par les bons résultats que nous avons obtenu en termes de rappel et de précision de notre classifieur.

Au vu des résultats encourageants obtenus, nous pouvons donner plusieurs points intéressants pouvant faire l'objet de perspectives pour de futures recherches. Nous citons, en particulier, les perspectives suivantes :

- Pour l'approche simultanée d'alignement et de reconstruction, nous pouvons convenir de raffiner le processus en intégrant d'autres paramètres dans la

fonction de coût. On pense particulièrement à l'anisotropie et à la fonction de transfert de contraste. Aussi, d'autres informations à priori concernant les structures recherchées dans l'image à reconstruire peuvent s'ajouter à la fonction de coût afin de guider le processus d'optimisation.

- La nature du calcul matriciel sur lequel notre processus de reconstruction est basé ouvre une perspective de parallélisation et une orientation vers la programmation GPU. Une telle modélisation devra permettre d'exploiter l'architecture parallèle des cartes graphiques dédiées aux applications de calculs intensifs et de bénéficier de l'accélération GPU.
- Bien qu'elle soit intéressante, l'information structurelle concernant la forme et la taille des ribosomes est, jusqu'à présent, absente dans notre approche. Une amélioration des performances de notre système de localisation des ribosomes peut être réalisée en exploitant ces informations.
- Pour la phase de classification, nous nous sommes limités dans ce travail à une seule source à savoir l'image de Hölder. Une perspective serait d'intégrer d'autres sources d'information, comme par exemple, l'image tomographique traitée par l'intégration fractionnaire afin de minimiser les erreurs de classification.
- Comme perspectives plus lointaines, nous pensons à l'expérimentation de notre approche pour d'autres domaines de l'imagerie biomédicale et particulièrement à des applications d'étude de changements et d'analyse IRM.

---

# Bibliographie

- [ACD<sup>+</sup>03] A. AVERBUCH, R.R. COIFMAN, D.L. DONOHO, M. ELAD et M. ISRAELI : Accurate and fast polar fourier transform. *In The 37th Asilomar on Signals, Systems and Computers*, Pacific Grove, CA, 2003.
- [ACD09] E. ARIAS-CASTRO et D. L. DONOHO : *The Annals of Statistics*, volume 37, chapitre Does median filtering truly preserve edges better than linear filtering?, pages 1172–1206. Institute of Mathematical Statistics, 2009.
- [ACDL<sup>+</sup>10] F. AMAT, D. CASTAÑO-DIEZ, A. LAWRENCE, F. MOUSSAVI, H. WINKLER et M. HOROWITZ : Alignment of cryo-electron tomography datasets. *Methods in Enzymology*, 482(10):343–367, 2010.
- [ACLS10] F. ATTIVISSIMO, G. CAVONE, A. M. L. LANZOLLA et M. SPADAVECCHIA : A technique to improve the image quality in computer tomography. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 59(5):1251–1257, May 2010.
- [AK84] A.H. ANDERSEN et A.C. KAK : Simultaneous algebraic reconstruction technique (SART) : A superior implementation of the ART algorithm. *Ultrasonic Imaging*, 6(1):81 – 94, 1984.
- [AK02] G. AUBERT et P. KORNPBST : *Mathematical Problems in Image Processing*. Springer, New York, 2002.
- [AMC<sup>+</sup>08] F. AMAT, F. MOUSSAVI, L.R. COMOLLI, G. ELIDAN, K.H. DOWNING et M. HOROWITZ : Markov random field based automatic



- image alignment for electron tomography. *Journal of Structural Biology*, 161(3):260 – 275, 2008. The 4th International Conference on Electron TomographyThe 4th International Conference on Electron Tomography.
- [ATM06] I. ARSLAN, J.R. TONG et P.A. MIDGLEY : Reducing the missing wedge : High-resolution dual axis tomography of inorganic materials. *Ultramicroscopy*, 106(12):994–1000, 2006.
- [AW95] V. AURICH et J. WEULE : Non-linear gaussian filters performing edge preserving diffusion. In Gerhard SAGERER, Stefan POSCH et Franz KUMMERT, éditeurs : *Mustererkennung 1995*, Informatik aktuell, pages 538–545. Springer Berlin Heidelberg, 1995.
- [BBSB<sup>+</sup>12] P. BINEV, F. BLANCO-SILVA, D. BLOM, W. DAHMEN, P. LAMBY, R. SHARPLEY et T. VOGT : *Modeling Nanoscale Imaging in Electron Microscopy*, chapitre High-Quality Image Formation by Non-local Means Applied to High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy (HAADF-STEM), pages 127–145. Springer, New York City, 2012.
- [BCH<sup>+</sup>10] F. BRANDT, L.-A. CARLSON, F.U. HARTL, W. BAUMEISTER et K. GRÜNEWALD : The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells. *Molecular Cell*, 39(4):560 – 569, 2010.
- [BCM05] A. BUADES, B. COLL et J.-M. MOREL : A non-local algorithm for image denoising. In *Computer Vision and Pattern Recognition, 2005. CVPR 2005. IEEE Computer Society Conference on*, volume 2, pages 60–65, June 2005.
- [BCMS<sup>+</sup>09] J.R. BILBAO-CASTRO, R. MARABINI, C.O.S. SORZANO, I. GARCÍA, J.M. CARAZO et J.J. FERNÁNDEZ : Exploiting desktop supercomputing for three-dimensional electron microscopy reconstructions using {ART} with blobs. *Journal of Structural Biology*, 165(1):19 – 26, 2009.

- [BCSGF10] J. R. BILBAO-CASTRO, C. O. S. SORZANO, I. GARCÍA et J. J. FERNÁNDEZ : Xmsf : Structure-preserving noise reduction and pre-segmentation in microscope tomography. *Bioinformatics*, 26(21): 2786–2787, 2010.
- [Ben08] J. BENECH : *Spécificité de la mise en œuvre de la tomographie dans le domaine de l'arc électrique - validité en imagerie médicale*. Thèse de doctorat, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2008.
- [BEO<sup>+</sup>09] F. BRANDT, S.A. ETCHELLS, J.O. ORTIZ, A.H. ELCOCK, F.U. HARTL et W. BAUMEISTER : The native 3D organization of bacterial polysomes. *Cell*, 136(2):261–271, Janvier 2009.
- [Bes86] Julian BESAG : On the statistical analysis of dirty pictures. *Journal Of The Royal Statistical Society*, B-48(3):48–259, 1986.
- [BF11] J.I. Agulleiro BALDO et J.J. FERNÁNDEZ : Fast tomographic reconstruction on multicore computers. *Bioinformatics*, 27(4):582–583, 2011.
- [Bio12] Yale Medical Cell BIOLOGY : Cell lab. [http://med-cell.med.yale.edu/histology/cell\\_lab.php](http://med-cell.med.yale.edu/histology/cell_lab.php), Juillet 2012.
- [BL79] S. BEUCHER et C. LANTUÉJOUL : Use of watersheds in contour detection. workshop published, septembre 1979.
- [Blo94] I. BLOCH : Fusion de données en traitement d'images : modèles d'information et décisions. *Traitement du Signal*, 11(6):435–446, 1994.
- [BN06] E.J. BASGALL et D. NICASTRO : Cryo - focused ion beam preparation of biological materials for retrieval and examination by cryo - tem. *Microscopy and Microanalysis*, 12:1132–1133, 8 2006.
- [Bon11] L. H. BONDE : *Acceleration of Iterative Methods for Reconstruction in Tomography*. Thèse de doctorat, Technical University of Denmark, DTU Informatics,, Lyngby, Denmark, 2011. Supervisé par Professor P. C. Hansen.
- [Bro29] L. De BROGLIE : The wave nature of the electron. *Nobel Lecture*, December 1929.

- [Bru02] P.P. BRUYANT : Analytic and iterative reconstruction algorithms in spect. *Journal of Nuclear Medicine*, 43(10):1343–1358, 2002.
- [BS07] K.J. BATENBURG et J. SIJBERS : *Computer Analysis of Images and Patterns : 12th International Conference, CAIP 2007, Vienna, Austria, August 27-29, 2007. Proceedings*, chapitre Optimal Threshold Selection for Tomogram Segmentation by Reprojection of the Reconstructed Image, pages 563–570. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [BS08] K. J. BATENBURG et J. SIJBERS : Automatic local thresholding of tomographic reconstructions based on the projection data. In Ehsan Samei JIANG HSIEH, éditeur : *SPIE Medical Imaging*, volume 6913, page 69132, San Diego, CA, USA, February 2008.
- [BS09] K.J. BATENBURG et J. SIJBERS : Optimal threshold selection for tomogram segmentation by projection distance minimization. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 28(5):676–686, 2009.
- [BSL<sup>+</sup>08] A. BARTESAGHI, P. SPRECHMANN, J. LIU, G. RANDALL, G. SA-PIRO et S. SUBRAMANIAM : Classification and 3D averaging with missing wedge correction in biological electron tomography. *Journal of Structural Biology*, 162(3):436 – 450, 2008.
- [BVVV99] P. BAKKER, L.J. VAN VLIET et P.W. VERBEEK : Edge preserving orientation adaptive filtering. In *Computer Vision and Pattern Recognition, 1999. IEEE Computer Society Conference on.*, volume 1, 1999.
- [BYA03] C. BAJAJ, Z. YU et M. AUER : Volumetric feature extraction and visualization of tomographic molecular imaging. *Journal of Structural Biology*, 144(1–2):132–143, 2003. Analytical Methods and Software Tools for Macromolecular Microscopy.
- [BZ06] S.S. BRANDT et U. ZIESE : Automatic TEM image alignment by trifocal geometry. *Journal of Microscopy*, 222:1–14, 2006.

- [CCX11] D. CHEN, Y. Quan CHEN et D. XUE : Digital fractional order savitzky-golay differentiator. *Circuits and Systems II : Express Briefs, IEEE Transactions on*, 58(11):758–762, Nov 2011.
- [CCX12] D. CHEN, Y.Q. CHEN et D. XUE : 1-d and 2-d digital fractional-order savitzky-golay differentiator. *Signal, Image and Video Processing*, 6(3):503–511, 2012.
- [CGS05] G. CARDONE, K. GRUNEWALD et A.C. STEVEN : A resolution criterion for electron tomography based on cross-validation. *Journal of Structural Biology*, 151(2):117–129, 2005.
- [CJB13] R. CHOUHAN, R. K. JHA et P. K. BISWAS : Enhancement of dark and low-contrast images using dynamic stochastic resonance. *IET Image Processing*, 7(2):174–184, March 2013.
- [CLW<sup>+</sup>15] J.-L. CHEN, L. LI, L.-Y. WANG, A.-L. CAI, X.-Q. XI, H.-M. ZHANG, J.-X. LI et B. YAN : Fast parallel algorithm for three-dimensional distance-driven model in iterative computed tomography reconstruction. *Chinese Physics B*, 24(2), 2015.
- [CM02] D. COMANICIU et P. MEER : Mean shift : a robust approach toward feature space analysis. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 24(5):603–619, May 2002.
- [Col98] C. COLLIEX : *La Microscopie Électronique*. Presses Universitaires de France, 1998.
- [CPH09] C. C. CHENG, G. J. PENG et W. L. HWANG : Subband Weighting With Pixel Connectivity for 3D Wavelet Coding. *IEEE Transactions on Image Processing*, 18(1):52–62, Jan 2009.
- [CRT94] A.C. COPELAND, G. RAVICHANDRANN et M.M. TRIVEDI : Localized radon transform based detection of linear features in noisy images. *In IEEE Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition*, pages 664–667, June 1994.

- [CVMP08] P. CIZMAR, A.E. VLADÁR, B. MING et M.T. POSTEK : Simulated sem images for resolution measurement. *Scanning*, 30(5):381–391, 2008.
- [CXC13] D.L. CHEN, D.Y. XUE et Y.Q. CHEN : Fractional differential-based approach for CT image enhancement. In *Advances in Chemical, Material and Metallurgical Engineering*, volume 634 de *Advanced Materials Research*, pages 3962–3965. Trans Tech Publications, 3 2013.
- [Dav91] W.C. DAVIDON : Variable metric method for minimization. *SIAM Journal on Optimization*, 1(1):1–17, 1991.
- [Dea81] S.R. DEANS : Hough transform from the radon transform. *IEEE trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 3, 1981.
- [Dea93] S.R. DEANS : *The Radon Transform and Some of Its Applications*. revised edition, Krieger, Malabar, FL., 1993.
- [Den89] J. DENGLER : A multi-resolution approach to the 3D reconstruction from an electron microscope tilt series solving the alignment problem without gold particles. *Ultramicroscopy*, 30(3):337–348, 1989.
- [DFKE07] K. DABOV, A. FOI, V. KATKOVNIK et K. EGIAZARIAN : Image denoising by sparse 3D transform-domain collaborative filtering. *IEEE Transactions on Image Processing*, 16(8):2080–2095, Aug 2007.
- [DGP09] F. DUBOIS, A.C. GALUCIO et N. POINT : *Introduction à la dérivation fractionnaire Théorie et applications*. 2009.
- [Dhi11] Z. Ben DHIAF : *Fusion de sources d'informations pour l'interprétation d'images de télédétections moyenne et haute résolution : Application à l'inventaire forestier*. Thèse de doctorat, Université de Tunis ElManar, Université des Antilles et de la Guyane, Mars 2011.
- [DKBB10] N.V. DUDKINA, R. KOURIL, J.B. BULTEMA et E.J. BOEKEMA : Imaging of organelles by electron microscopy reveals protein-protein interactions in mitochondria and chloroplasts. *{FEBS} Letters*, 584(12):2510 – 2515, 2010. Gothenburg Special Issue : Molecules of Life.

- [DMF07] D.C. DIEZ, H. MUELLER et A.S. FRANGAKIS : Implementation and performance evaluation of reconstruction algorithms on graphics processors. *Journal of Structural Biology*, 157(1):288 – 295, 2007. Software tools for macromolecular microscopy.
- [DY99] Y. H. DAI et Y. YUAN : A nonlinear conjugate gradient method with a strong global convergence property. *SIAM J. on Optimization*, 10(1):177–182, mai 1999.
- [EFNH15] I. ELOUEDI, R. FOURNIER, A. NAÏT-ALI et A. HAMOUDA : The polynomial discrete radon transform. *Signal, Image and Video Processing*, 9(Supplement-1):145–154, 2015.
- [FB81] M. FISCHLER et R. BOLLES : Random sample consensus : A paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Communications of the ACM*, 24(6):381–395, 1981.
- [Fer04] J.J. FERNÁNDEZ : Three-dimensional reconstruction of cellular structures by electron microscope tomography and parallel computing. *Journal of Parallel and Distributed Computing*, 64(2):285–300, 2004.
- [FGCU16] D. FORTUN, P. GUICHARD, N. CHU et M. UNSER : Reconstruction from multiple poses in fluorescence imaging : Proof of concept. *IEEE Journal of Selected Topics in Signal Processing*, 10(1):61–70, Feb 2016.
- [FH01] A.S. FRANGAKIS et R. HEGERL : Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion. *Journal of Structural Biology*, 135(3):239 – 250, 2001.
- [FH02] A.S. FRANGAKIS et R. HEGERL : Segmentation of two- and three-dimensional data from electron microscopy using eigenvector analysis. *Journal of Structural Biology*, 138(1–2):105–113, 2002.
- [FL03] J.J. FERNÁNDEZ et S. LI : An improved algorithm for anisotropic nonlinear diffusion for denoising cryo-tomograms. *Journal of Structu-*

- ral Biology*, 144(1-2):152–161, 2003. Analytical Methods and Software Tools for Macromolecular Microscopy.
- [FLC06] J.J. FERNÁNDEZ, S. LI et R.A. CROWTHER : CTF determination and correction in electron cryotomography. *Ultramicroscopy*, 106(7):587 – 596, 2006.
- [FLR+02] J.J FERNÁNDEZ, A.F. LAWRENCE, J. ROCA, I. GARCIA, M.H. ELLISMAN et J.M. CARAZO : High-performance electron tomography of complex biological specimens. *Journal of Structural Biology*, 138(1–2):6–20, 2002.
- [FM92] J. FRANK et B.F. MCEWEN : *Electron Tomography : Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope*, chapitre Alignment by Cross-Correlation, pages 205–213. Springer US, Boston, MA, 1992.
- [Fou22] J. B. J. FOURIER : *Théorie analytique de la chaleur*. Didot, 1822.
- [Fra06a] J. FRANK : *Electron tomography : methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*. Springer-Verlag New York, 2 édition, 2006.
- [Fra06b] J. FRANK : *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies : visualization of biological molecules in their native state*. Oxford University Press US, 2006.
- [FRP+96] J. FRANK, M. RADERMACHER, P. PENCZEK, J. ZHU, Y. LI, M. LADJADJ et A. LEITH : {SPIDER} and web : Processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *Journal of Structural Biology*, 116(1):190 – 199, 1996.
- [GBH70] R. GORDON, R. BENDER et G.T. HERMAN : Algebraic Reconstruction Techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and X-ray photography. *Journal of Theoretical Biology*, 29(3):471–481, décembre 1970.
- [GBKC13] A. GUESDON, S. BLESTEL, C. KERVRANN et D. CHRÉTIEN : Single versus dual-axis cryo-electron tomography of microtubules assembled

- in vitro : Limits and perspectives. *Journal of Structural Biology*, 181(2):169–178, 2013.
- [GdBB<sup>+</sup>12] B. GORIS, W. Van den BROEK, K.J. BATENBURG, H. Heidari MEZERJI et S. BALS : Electron tomography based on a total variation minimization reconstruction technique. *Ultramicroscopy*, 113:120–130, 2012.
- [GHV04] M. Van GINKEL, C.L. HENDRIKS et L.J. Van VLIET : *A short introduction to the Radon and Hough transforms and how they relate to each other*. 2004.
- [Gil72] P. GILBERT : Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections. *Journal of Theoretical Biology*, 36(1):105–117, 1972.
- [Gla93] C.A. GLASBEY : An Analysis of Histogram-Based Thresholding Algorithms. *CVGIP : Graphical Models and Image Processing*, 55(6):532 – 537, 1993.
- [GLQIMr12] H. GUO, X. LI, C. QING-LI et W. MING-RONG : Image denoising using fractional integral. In *Computer Science and Automation Engineering (CSAE), 2012 IEEE International Conference on*, volume 2, pages 107–112, May 2012.
- [Gîr10] M. GÎRLEANU : *Etude de la structure de films minces de nitrure de titane et d'aluminium  $Ti_{1-x}AlxN$  ( $0 \leq x \leq 1$ ) et son rôle sur l'indentation*. Thèse de doctorat, Université de Haute Alsace-Mulhouse, 2010.
- [Gra03] J. GRAZZINI : *Analyse multiéchelle et multifractale d'images météorologiques : Application à la détection de zones précipitantes*. Thèse de doctorat, Université de Marne la Vallée, 2003.
- [Gre90] P.J. GREEN : Bayesian reconstructions from emission tomography data using a modified em algorithm. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 9(1):84–93, Mar 1990.



- [HA04] N. HASSAN et N. AKAMATSU : A new approach for contrast enhancement using sigmoid function. *Int. Arab J. Inf. Technol.*, 1(2):221–225, 2004.
- [HDH13] A. HEROUT, M. DUBSKA et J. HAVEL : *Real-Time Detection of Lines and Grids*. Springerbriefs in Computer Science. Springer, 2013.
- [Her09] G.T. HERMAN : *Fundamentals of Computerized Tomography : Image Reconstruction from Projections*. Advances in Pattern Recognition. Springer, 2009.
- [HHW60] P. B. HIRSCH, A. HOWIE et M. J. WHELAN : A kinematical theory of diffraction contrast of electron transmission microscope images of dislocations and other defects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 252(1017):499–529, 1960.
- [HITO13] M. HAYASHIDA, T. IJIMA, M. TSUKAHARA et S. OGAWA : High-precision alignment of electron tomography tilt series using markers formed in helium-ion microscope. *Micron*, 50:29 – 34, 2013.
- [HL94] H. M. HUDSON et R. S. LARKIN : Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 13(4):601–609, Dec 1994.
- [Hou62] P.V.C. HOUGH : Methods and means for recognizing complex patterns. *U.S. Patent*, 1962.
- [Hov92] S. HOVMÖLLER : Crisp : crystallographic image processing on a personal computer. *Ultramicroscopy*, 41(1):121–135, 1992.
- [HPZ11] J. HU, Y. PU et J. ZHOU : A novel image denoising algorithm based on Riemann-Liouville definition. *JCP*, 6(7):1332–1338, 2011.
- [HS52] M.R. HESTENES et E. STIEFEL : Methods of Conjugate Gradients for Solving Linear Systems. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 49(6):409–436, 1952.
- [HS88] C. HARRIS et M. STEPHENS : A combined corner and edge detector. *In In Proc. of Fourth Alvey Vision Conference*, pages 147–151, 1988.

- [HSF<sup>+</sup>84] S. HOVMÖLLER, A. SJÖGREN, G. FARRANTS, M. SUNDBERG et B.O. MARINDER : Accurate atomic positions from electron microscopy. *Nature*, 311:238–241, 1984.
- [Hum75] R.A. HUMMEL : Histogram modification techniques. *Computer Graphics and Image Processing*, 4(3):209 – 224, 1975.
- [HvH86] G. HARAUZ et M. van HEEL : Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. In *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, volume 73, pages 146–156, 1986.
- [HW95] L.K. HUANG et M.J. WANG : Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness. *Pattern recognition*, 28(1):41–51, 1995.
- [HXM<sup>+</sup>07] P. Van Der HEIDE, X.P. XU, B.J. MARSH, D. HANEIN et N. VOLK-MANN : Efficient automatic noise reduction of electron tomographic reconstructions based on iterative median filtering. *Journal of Structural Biology*, 158(2):196–204, 2007.
- [JI12] H.A. JALAB et R.W. IBRAHIM : Texture feature extraction based on fractional mask convolution with cesáro means for content-based image retrieval. In *Proceedings of the 12th Pacific Rim International Conference on Trends in Artificial Intelligence, PRICAI'12*, volume 7458 de *Lecture Notes in Computer Science*, pages 170–179. Springer, 2012.
- [JI13a] H.A. JALAB et R.W. IBRAHIM : Texture enhancement based on the savitzky-golay fractional differential operator. *Mathematical Problems in Engineering*, 2013:8, 2013.
- [JI13b] H.A. JALAB et R.W. IBRAHIM : Texture enhancement for medical images based on fractional differential masks. *Discrete Dynamics in Nature and Society*, 2013:10, 2013.
- [Jos82] P.M. JOSEPH : An improved algorithm for reprojecting rays through pixel images. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 1(3):192–196, Nov 1982.

- [Kau93] L. KAUFMAN : Maximum likelihood, least squares, and penalized least squares for pet. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 12(2): 200–214, Jun 1993.
- [KBC14] C. KERVRANN, S. BLESTEL et D. CHRÉTIEN : Conditional random fields for tubulin-microtubule segmentation in cryo-electron tomography. In *2014 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, pages 2080–2084, Oct 2014.
- [KEM08] C. KISIELOWSKI, R. ERNI et J. MEYER : *EMC 2008 14th European Microscopy Congress 1–5 September 2008, Aachen, Germany : Volume 2 : Materials Science*, chapitre Electron beam induced damage : An atom-by-atom investigation with TEAM0.5, pages 39–40. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [KHB<sup>+</sup>12] Y.M. KIM, J. HE, M.D. BIEGALSKI, H. AMBAYE, V. LAUTER, H.M. CHRISTEN, S.T. PANTELIDES, S.J. PENNYCOOK, S.V. KALININ et A.Y. BORISEVICH : Probing oxygen vacancy concentration and homogeneity in solid-oxide fuel-cell cathode materials on the subunit-cell level. *Nature Materials*, 11(10):888–894, 2012.
- [KHEK76] M. KUWAHARA, K. HACHIMURA, S. EIHO et M. KINOSHITA : Processing of ri-angiocardigraphic images. In Jr. PRESTON, K. et M. ONOE, éditeurs : *Digital Processing of Biomedical Images*, pages 187–202. Springer US, 1976.
- [Kin05] A.M. KINGSTON : *Extension and Application of Finite Discrete Radon Projection Theory*. Thèse de doctorat, School of Physics, Monash University, Australia, September 2005.
- [Klu79] A. KLUG : Image analysis and reconstruction in the electron microscopy of biological macromolecules. *Chemica Scripta*, 14, 1979.
- [KMM96] J.R. KREMER, D.N. MASTRONARDE et J.R. MCINTOSH : Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Struct. Biol*, 116:110–118, 1996.

- [KRW14] C. KERVRANN, P. ROUDOT et F. WAHARTE : Approximate Bayesian Computation, stochastic algorithms and non-local means for complex noise models. *In IEEE International Conference on Image Processing*, page 4, Paris, France, octobre 2014.
- [KS88] Avinash C KAK et Malcolm SLANEY : *Principles of Tomographic Imaging*. IEEE Service Center, Piscataway, NJ, 1988.
- [KS01] A.C. KAK et M. SLANEY : *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. Society of Industrial and Applied Mathematics, 2001.
- [KST06] A. A. KILBAS, H. M. SRIVASTAVA et J. J. TRUJILLO : *Theory and Applications of Fractional Differential Equations, Volume 204 (North-Holland Mathematics Studies)*. Elsevier Science Inc., New York, NY, USA, 2006.
- [KSW85] J.N. KAPUR, P.K. SAHOO et A.K.C. WONG : A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 29(3):273–285, 1985.
- [Kui99] J.B. KUIPERS : *Quaternions and rotation sequences : a primer with applications to orbits, aerospace, and virtual reality*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 1999.
- [LBHA13] A. LOZA, D.R. BULL, P.R. HILL et A.M. ACHIM : Automatic contrast enhancement of low-light images based on local statistics of wavelet coefficients. *Digital Signal Processing*, 23(6):1856 – 1866, 2013.
- [LBU07] F. LUISIER, T. BLU et M. UNSER : A new SURE approach to image denoising : Interscale orthonormal wavelet thresholding. *IEEE Transactions on Image Processing*, 16(3):593–606, March 2007.
- [LBU11] F. LUISIER, T. BLU et M. UNSER : Image denoising in mixed poisson-gaussian noise. *IEEE Transactions on Image Processing*, 20(3):696–708, March 2011.

- [LFB05] V. LUCIC, F. FÖRSTER et W. BAUMEISTER : Structural studies by electron tomography : from cells to molecules. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1):833–865, 2005.
- [LN83] A. K. LOUIS et F. NATTERER : Mathematical problems of computerized tomography. *Proceedings of the IEEE*, 71(3):379–389, March 1983.
- [LN89] D.C. LIU et J. NOCEDAL : On the limited memory bfgs method for large scale optimization. *Mathematical Programming*, 45(1):503–528, 1989.
- [LVH07] Z.H. LEVINE, A. VOLKOVITSKY et H.K. HUNG : Alignment of fiducial marks in a tomographic tilt series with an unknown rotation axis. *Computer Physics Communications*, 176(11-12):694–700, 2007.
- [Mal89] S. G. MALLAT : A theory for multiresolution signal decomposition : the wavelet representation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 11(7):674–693, Jul 1989.
- [MAM<sup>+</sup>14] A.G. MYASNIKOV, Z.A. AFONINA, J.-F. MÉNÉTRÉ, V.A. SHIROKOV, A.S. SPIRIN et B.P. KLAHOLZ : The molecular structure of the left-handed supra-molecular helix of eukaryotic polyribosomes. *Nature Communications*, 5(5294):1–8, 2014.
- [MAOM14] Yoann Le MONTAGNER, Elsa D. ANGELINI et Jean-Christophe OLIVO-MARIN : An unbiased risk estimator for image denoising in the presence of mixed poisson-gaussian noise. *IEEE Trans. Image Processing*, 23(3):1255–1268, 2014.
- [Mas99] D.N. MASTRONARDE : Dual-axis tomography : An approach with alignment methods that preserve resolution. *Struct. Biol*, 120:343–352, 1999.
- [MB04] B. De MAN et S. BASU : Distance-driven projection and back-projection in three dimensions. *Physics in Medicine and Biology*, 49(11):2463, 2004.

- [MBD<sup>+</sup>15] N. MEVENKAMP, P. BINEV, W. DAHMEN, P.M. VOYLES, A.B. YANKOVICH et B. BERKELS : Poisson noise removal from high-resolution stem images based on periodic block matching. *Advanced Structural and Chemical Imaging*, 1(1):1–19, 2015.
- [MBG<sup>+</sup>14] A. MIRONE, E. BRUN, E. GOUILLART, P. TAFFOREAU et J. KIEFFER : The pyhst2 hybrid distributed code for high speed tomographic reconstruction with iterative reconstruction and a priori knowledge capabilities. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, 324:41–48, 2014. 1st International Conference on Tomography of Materials and Structures.
- [McA04] A. MCANDREW : *An introduction to digital image processing with MATLAB*. Brooks/Cole, School of Computer Science and Mathematics, Victoria University of Technology, 2004.
- [MDM<sup>+</sup>11] F. MOMEY, L. DENIS, C. MENNESSIER, E. THIEBAUT, J.-M. BECKER et L. DESBAT : A new representation and projection model for tomography, based on separable b-splines. *In Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference (NSS/MIC), 2011 IEEE*, pages 2602–2609, Oct 2011.
- [MDZ96] R. D. MORRIS, X. DESCOMBES et J. ZERUBIA : The ising/potts model is not well suited to segmentation tasks. *In Digital Signal Processing Workshop Proceedings, 1996., IEEE*, pages 263–266, Sep 1996.
- [Mey90] Y. MEYER : Wavelets and applications. *In International Congress of Mathematics*, Kyoto, 1990.
- [Mez12] H.H. MEZERJI : *Quantitative electron tomography of nanoparticles*. Thèse de doctorat, University of Antwerp, 2012.
- [MFM04] D.R. MARTIN, C.C. FOWLKES et J. MALIK : Learning to detect natural image boundaries using local brightness, color, and texture cues. *PAMI*, 26(5):530–549, 2004.

- [MG03] J.A. MINDELL et N. GRIGORIEFF : Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 142(3):334–347, 2003.
- [MHC98] R. MARABINI, G. T. HERMAN et J. M. CARAZO : 3D reconstruction in electron microscopy using {ART} with smooth spherically symmetric volume elements (blobs). *Ultramicroscopy*, 72(1-2):53–65, 1998.
- [MKS99] R.R. MEYER, A.I. KIRKLAND et W.O. SAXTON : *Electron Microscopy and Analysis*, chapitre Accurate characterization of CCD cameras for electrons detection, pages 267–306. Institute of Physics Conference Series, University of Sheffield, 1999.
- [MS95] J.M. MOREL et S. SOLIMINI : *Variation Methods for Image Segmentation*. Birkhäuser, Boston, 1995.
- [MS01] S. and Leung T. MALIK, J. and Belongie et J. SHI : Contour and texture analysis for image segmentation. *International Journal of Computer Vision*, 43(1):7–27, 2001.
- [MS05] K. MIKOLAJCZYK et C. SCHMID : A performance evaluation of local descriptors. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 27(10):1615–1630, 2005.
- [MS12] F. MARONE et M. STAMPANONI : Regridding reconstruction algorithm for real-time tomographic imaging. *Journal of Synchrotron Radiation*, 19(6):1029–1037, Nov 2012.
- [MTM<sup>+</sup>14] F. MOMEY, E. THIEBAUT, C. MENNESSIER, L. DENIS et J.-M. BECKER : Spline driven : high accuracy projectors for 3D tomographic reconstruction from few projections. *submitted*, may 2014.
- [MW03] P.A. MIDGLEY et M. WEYLAND : 3D electron microscopy in the physical sciences : the development of z-contrast and {EFTEM} tomography. *Ultramicroscopy*, 96(3–4):413–431, 2003. Proceedings of the International Workshop on Strategies and Advances in Atomic Level Spectroscopy and Analysis.

- [MWF<sup>+</sup>02] O. MEDALIA, I. WEBER, A.S. FRANGAKIS, D. NICASTRO, G. GERISCH et W. BAUMEISTER : Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 298(5596): 1209–1213, 2002.
- [Ner96] A. NERI : *IEEE Trans. Image Processing*, 5(5):787–792, 1996.
- [NJ08] H. NGUYEN et Q. JI : Shape-driven three-dimensional watersnake segmentation of biological membranes in electron tomography. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 27(5):616–628, May 2008.
- [NP98] P. D. NELLIST et S. J. PENNYCOOK : Accurate structure determination from image reconstruction in adf stem. *Journal of Microscopy*, 190(1-2):159–170, 1998.
- [NW06] J. NOCEDAL et S. WRIGHT : *Numerical Optimization*. Springer Series in Operations Research and Financial Engineering. 2 édition, 2006.
- [NWVdB03] H. NGUYEN, M. WORRING et R. Van den BOOMGAARD : Watersnakes : energy-driven watershed segmentation. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 25(3):330–342, March 2003.
- [OA04] M.A. O’KEEFE et L.F. ALLARD : A standard for sub-Ångstrom metrology of resolution in aberration-corrected transmission electron microscopes. *Microscopy and Microanalysis*, 10:1002–1003, 8 2004.
- [OFK<sup>+</sup>06] J.O. ORTIZ, F. FÖRSTER, J. KÜRNER, A.A. LINAROUDIS et W. BAUMEISTER : Mapping 70s ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition. *Journal of Structural Biology*, 156(2):334 – 341, 2006.
- [OS11] E. V. ORLOVA et H. R. SAIBIL : Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. *Chemical Reviews*, 111(12):7710–7748, 2011.



- [Ots79] N. OTSU : A Threshold Selection Method from Gray-level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, 9(1):62–66, 1979.
- [PAA<sup>+</sup>87] S.M. PIZER, E.P. AMBURN, J.D. AUSTIN, R. CROMARTIE, A. GESELOWITZ, T. GREER, B.T.H. ROMENY et J.B. ZIMMERMAN : Adaptive histogram equalization and its variations. *Comput. Vision Graph. Image Process.*, 39(3):355–368, 1987.
- [Pap77] A. PAPOULIS : *Signal Analysis*. McGraw-Hill, New York, 1977.
- [PBS11] W J PALENSTIJN, K J BATENBURG et J SIJBERS : Performance improvements for iterative electron tomography reconstruction using graphics processing units (GPUs). *Journal of Structural Biology*, 176(2):250–253, 2011.
- [PBW<sup>+</sup>12] P. PLEVKA, A. J. BATTISTI, D. C. WINKLER, K. TARS, H. A. HOLDAWAY, C. M. BATOR et M. G. ROSSMANN : Sample preparation induced artifacts in cryo-electron tomographs. *Microscopy and Microanalysis : The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 18(5):1043–1048, 2012.
- [Pen02] P.A. PENCZEK : Three-dimensional spectral signal-to-noise ratio for a class of reconstruction algorithms. *Journal of Structural Biology*, 138(1–2):34–46, 2002.
- [Pen10] P.A. PENCZEK : Resolution measures in molecular electron microscopy. *Methods in enzymology*, 482:73–100, 2010.
- [Pet08] B.L. PETERSON : *TEM Sample Preparation Tips*. FEI Company, 2008.
- [PM90] P. PERONA et J. MALIK : Scale-space and edge detection using anisotropic diffusion. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 12(7):629–639, Jul 1990.
- [PMG96] F. PEYRIN, I. MAGNIN et L. GARNERO : Introduction to 2D and 3D tomographic methods based on straight line propagation : X-ray,

- emission and ultrasonic tomography. *Traitement du Signal*, 13(4): 381–413, 1996.
- [PMV03] J.P.W. PLUIM, J.B.A. MAINTZ et M.A. VIERGEVER : Mutual-information-based registration of medical images : a survey. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 22(8):986–1004, Aug 2003.
- [PPC07] G. PAPARI, N. PETKOV et P. CAMPISI : Artistic edge and corner enhancing smoothing. *Image Processing, IEEE Transactions on*, 16(10):2449–2462, Oct 2007.
- [PRH<sup>+</sup>06] R. S. PANTELIC, R. ROTHNAGEL, C.-Y. HUANG, D. MULLER, D. WOOLFORD, M. J. LANDSBERG, A. MCDOWALL, B. PAILTHORPE, P. R. YOUNG, J. BANKS, B. HANKAMER et G. ERICKSSON : The discriminative bilateral filter : An enhanced denoising filter for electron microscopy data. *Journal of Structural Biology*, 155(3):395 – 408, 2006.
- [PST01] D. POTTS, G. STEIDL et M. TASCHE : *Fast Fourier Transforms for Nonequispaced Data : A Tutorial*, pages 247–270. Birkhäuser Boston, Boston, MA, 2001.
- [PTS<sup>+</sup>13] S. PODDAR, S. TEWARY, D. SHARMA, V. KARAR, A. GHOSH et S. K. PAL : Non-parametric modified histogram equalisation for contrast enhancement. *IET Image Processing*, 7(7):641–652, October 2013.
- [PV92] I. PITAS et A.N. VENETSANOPOULOS : Order statistics in digital image processing. *Proceedings of the IEEE*, 80(12):1893–1921, Dec 1992.
- [Rad17] J. RADON : Ufiber die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integral-werte langs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Berichte Sachsische Akademie der Wissenschaften, Leipzig, Math-Phys. Kl*, 62:262–267, 1917.
- [Rad92] M. RADERMACHER : *Electron Tomography : Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope*, chapitre Weighted

- Back-projection Methods, pages 91–115. Springer US, Boston, MA, 1992.
- [RBB<sup>+</sup>12] T. ROELANDTS, K.J. BATENBURG, E. BIERMANS, C. KÜBEL, S. BALS et J. SIJBERS : Accurate segmentation of dense nanoparticles by partially discrete electron tomography. *Ultramicroscopy*, 114:96–105, 2012.
- [RBN<sup>+</sup>16a] H. ROJBANI, E. BAUDRIER, B. NAEGEL, L. MAZO et A. HAMOUDA : Angular uncertainty refinement and image reconstruction improvement in cryo-electron tomography. In *Proceedings of the 11th Joint Conference on Computer Vision, Imaging and Computer Graphics Theory and Applications (VISIGRAPP 2016) - Volume 3 : VISAPP, Rome, Italy, February 27-29, 2016.*, pages 96–102, 2016.
- [RBN<sup>+</sup>16b] H. ROJBANI, E. BAUDRIER, B. NAEGEL, L. MAZO et A. HAMOUDA : Joint 3d alignment-reconstruction multi-scale approach for cryo electron tomography. In *13th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, ISBI 2016, Prague, Czech Republic, April 13-16, 2016*, pages 1109–1113, 2016.
- [RBN<sup>+</sup>16c] H. ROJBANI, E. BAUDRIER, B. NAEGEL, L. MAZO et A. HAMOUDA : VAR a new metric of cryo-electron tomography resolution. In *Proceedings of the 11th Joint Conference on Computer Vision, Imaging and Computer Graphics Theory and Applications (VISIGRAPP 2016) - Volume 3 : VISAPP, Rome, Italy, February 27-29, 2016.*, pages 156–161, 2016.
- [Rei98] L. REIMER : *Scanning Electron Microscopy : Physics of Image Formation and Microanalysis*. Springer Series in Optical Sciences. Springer Berlin Heidelberg, 1998.
- [Rou69] M. ROUSSEAU : Propriétés statistiques des photoélectrons. *Le Journal De Physique*, page 675, 1969.
- [SAM07] J. SABATIER, O.P. AGRAWAL et J. A. Tenreiro MACHADO : *Advances in Fractional Calculus Theoretical Developments and Applications in*

- Physics and Engineering*. 2007.
- [SB82] W. O. SAXTON et W. BAUMEISTER : The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *Journal of Microscopy*, 127(2):127–138, 1982.
- [SB14] P. SHANMUGAVADIVU et K. BALASUBRAMANIAN : Particle swarm optimized multi-objective histogram equalization for image enhancement. *Optics & Laser Technology*, 57:243–251, 2014. Optical Image Processing.
- [SBH84] W.O. SAXTON, W. BAUMEISTER et M. HAHN : Three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals. *Ultramicroscopy*, 13(1-2):57–70, 1984.
- [SC96] J.R. SMITH et S.F. CHANG : In *Proceedings of the IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing, ICASSP'96*, pages 2239–2242. IEEE Computer Society, 1996.
- [SF04] M. SONKA et J.M. FITZPATRICK : *Handbook of Medical image processing and analysis*. SPIE Press, Bellingham, Washington, USA, 2004.
- [SGCV06] N. SONG, I.Y.H. GU, Z. CAO et M. VIBERG : Enhanced spatial-range mean shift color image segmentation by using convergence frequency and position. In *Signal Processing Conference, 2006 14th European*, pages 1–5, Sept 2006.
- [SM97] J. SHI et J. MALIK : Normalized cuts and image segmentation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 22:888–905, 1997.
- [Sme98] P. SMETS : *Quantified Representation of Uncertainty and Imprecision*, chapitre Probability, Possibility, Belief : Which and Where?, pages 1–24. Springer Netherlands, Dordrecht, 1998.
- [SME<sup>+</sup>09] C. SORZANO, C. MESSAOUDI, M. EIBAUER, J. BILBAO-CASTRO, R. HEGERL, S. NICKELL, S. MARCO et J. CARAZO : Marker-free

- image registration of electron tomography tilt-series. *BMC Bioinformatics*, 10(1):124, 2009.
- [SOBB96] U. SKOGLUND, L.G. OFVERSTEDT, R.M. BURNETT et G. BRICOGNE : Maximum-entropy three-dimensional reconstruction with deconvolution of the contrast transfer function : A test application with adenovirus. *Journal of Structural Biology*, 117(3):173 – 188, 1996.
- [ST99] M. SIGELLE et F. TUPIN : Champs de Markov en traitement d'images. Rapport Technique, Cours de l'Ecole Nationale Supérieure de Télécommunication de Paris, 1999.
- [STP04] K.S. SIM, J.T.L. THONG et J.C.H. PHANG : Effect of shot noise and secondary emission noise in scanning electron microscope images. *Scanning*, 26(1):36–40, 2004.
- [TBU00] P. THEVENAZ, T. BLU et M. UNSER : Interpolation revisited [medical images application]. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 19(7):739–758, July 2000.
- [TM98] C. TOMASI et R. MANDUCHI : Bilateral filtering for gray and color images. In *Computer Vision, 1998. Sixth International Conference on*, pages 839–846, Jan 1998.
- [TM08] T. TUYTELAARS et K. MIKOLAJCZYK : Local invariant feature detectors : A survey. *FnT Comp. Graphics and Vision*, pages 177–280, 2008.
- [TMT<sup>+</sup>13] V.D. TRAN, M. MOREAUD, É. THIÉBAUT, L. DENIS et J. M. BECKER : Inverse Problem Approach for the Alignment of Electron Tomographic Series. *Oil & Gas Science and Technology - Revue d'IFP Energies nouvelles*, 69(2):279–291, 2013.
- [TP00a] A. TURIEL et N. PARGA : The multifractal structure of contrast changes in natural images : From sharp edges to textures. *Neural Computation*, 12(4):763–793, 2000.

- [TP00b] A. TURIEL et N. PARGA : Multifractal wavelet filter of natural images. *Physical Review Letters*, 85:3325–3328, Oct 2000.
- [Tra13] V.D. TRAN : *Reconstruction et segmentation d'image 3D de tomographie électronique par approche "problème inverse"*. Electronics, Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013.
- [Uns00] M. UNSER : Sampling-50 years after shannon. *Proceedings of the IEEE*, 88(4):569–587, April 2000.
- [UST+05] M. UNSER, C.O.S. SORZANO, P. THÉVENAZ, S. JONIC, C. EL-BEZ, S. De CARLO, J.F. CONWAY et B.L. TRUS : Spectral signal-to-noise ratio and resolution assessment of 3d reconstructions. *Journal of Structural Biology*, 149(3):243–255, 2005.
- [vHS05] M. van HEEL et M. SCHATZ : Fourier shell correlation threshold criteria. *Journal of Structural Biology*, 151(3):250–262, 2005.
- [Vol02] N. VOLKMANN : A novel three-dimensional variant of the watershed transform for segmentation of electron density maps. *Journal of Structural Biology*, 138(1–2):123–129, 2002.
- [WC09] D.B. WILLIAMS et C.B. CARTER : *Transmission Electron Microscopy : A Textbook for Materials Science*. Springer : Huntsville AL, USA, 2009.
- [Wei99] J. WEICKERT : Coherence-enhancing diffusion filtering. *International Journal of Computer Vision*, 31(2):111–127, 1999.
- [WL06] J.W. WANG et Y.J. LI : *MATLAB 7.0 Image Processing*. Beijing : National Defence Industry Publishing, 2006.
- [WSS13] L. WANG, Y. SHKOLNISKY et A. SINGER : A fourier-based approach for iterative 3d reconstruction from cryo-em images. *arXiv preprint arXiv : 1307.5824v*, pages 1–17, 2013.
- [Wu82] F. Y. WU : The potts model. *Review of Modern Physics.*, 54:235–268, Jan 1982.

- [WY10] D.Y. WEI et C.C. YIN : An optimized locally adaptive non-local means denoising filter for cryo-electron microscopy data. *Journal of Structural Biology*, 172(3):211 – 218, 2010.
- [WZL09] X. WAN, F. ZHANG et Z. LIU : Modified simultaneous algebraic reconstruction technique and its parallelization in cryo-electron tomography. In *Parallel and Distributed Systems (ICPADS), 2009 15th International Conference on*, pages 384–390, Dec 2009.
- [XXJ<sup>+</sup>10] W. XU, F. XU, M. JONES, B. KESZTHELYI, J. SEDAT, D. AGARD et K. MUELLER : High-performance iterative electron tomography reconstruction with long-object compensation using graphics processing units (gpu). *Journal of Structural Biology*, 171(2):142 – 153, 2010.
- [Yan06] C-C YANG : Image enhancement by modified contrast-stretching manipulation. *Optics & Laser Technology*, 38(3):196 – 201, 2006.
- [YNP05] C. YANG, E.G. NG et P.A. PENCZEK : Unified 3D structure and projection orientation refinement using quasi-Newton algorithm. *Journal of Structural Biology*, 149(1):53–64, janvier 2005.
- [ZCS13] C. ZUO, Q. CHEN et X0 SUI : Range limited bi-histogram equalization for image contrast enhancement. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 124(5):425–431, 2013.
- [ZFS08] B. ZHANG, J. M. FADILI et J. L. STARCK : Wavelets, ridgelets, and curvelets for poisson noise removal. *IEEE Transactions on Image Processing*, 17(7):1093–1108, July 2008.
- [ZFSOM07] B. ZHANG, M. J. FADILI, J. L. STARCK et J. C. OLIVO-MARIN : Multiscale variance-stabilizing transform for mixed-poisson-gaussian processes and its applications in bioimaging. In *2007 IEEE International Conference on Image Processing*, volume 6, pages 233–236, Sept 2007.
- [ZLM<sup>+</sup>12] M. ZENG, Y. LI, Q. MENG, T. YANG et J. LIU : Improving histogram-based image contrast enhancement using gray-level information histo-

gram with application to x-ray images. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 123(6):511–520, 2012.

- [ZSA10] Q.S. ZHENG, J.W. SEDAT et D.A. AGARD : Automated data collection for electron microscopic tomography. *Methods in Enzymology*, 481(10):283–315, 2010.



---

# Acronymes et définitions

**MET** Microscope électronique en transmission.

**MEB** Microscope électronique à balayage.

**CTE** Cryo tomographie électronique.

**TM** Tomographie médicale.

**IRM** Imagerie par résonance magnétique.

**MD** Mode diffraction.

**MI** Mode image.

**CC** Champ clair.

**CS** Champ sombre.

**TR** Transformée de Radon.

**TF** Transformée de Fourier.

**TO** Transformée en ondelettes.

**ER** Espace de Radon.

**RPF** Rétroprojection filtrée.

**ART** Techniques de reconstruction algébrique.

**SART** Techniques de reconstruction algébrique simultanée.

**SIRT** Techniques de reconstruction itérative simultanée.

**GC** Gradient conjugué.

**EQMN** Erreur quadratique moyenne normalisée.

**MCO** Mesure de correction d'orientation.

**VAR** Assomption visuelle de la résolution.

**EA** Erreur angulaire.

**SNR** Rapport signal/bruit.

**PSNR** Pic du rapport signal/bruit.

# A

---

## Analyse multi-fractale

### A.1 Construction de la mesure multi-fractale

Nous allons rappeler puis appliquer dans cette section une analyse multi-fractale basée sur le modèle proposé par Turiel et Parga dans [TP00a, TP00b]. Pour faire une analyse multi-fractale, il faut commencer par définir une mesure sur l'image. Dans ce qui suit, nous allons travailler avec la norme du stationnaire (la norme du gradient donne un signal stationnaire), en effectuant un développement à l'ordre 2 du signal :

$$I(\vec{x})_{\vec{y}} = I(\vec{x}) + \vec{y} \cdot \nabla I(\vec{x}) + O(|\vec{y}|^2) \quad (\text{A.1})$$

où  $\vec{y}$  est une translation.

#### A.1.1 Calcul de la mesure stationnaire

**Définition** : Pour une image  $I$  représentée par sa fonction de luminance  $I(\vec{x})$  en chaque pixel  $\vec{x}$ , nous introduisons une mesure  $\mu$  de densité :

$$d\mu = d\vec{x} |\nabla I|(\vec{x}) \quad (\text{A.2})$$

Où  $|\nabla I|(\vec{x})$  désigne la norme du gradient  $\nabla I$  de l'image  $I$ , et la fonction  $\mu$  définit la mesure positive d'un sous ensemble quelconque  $A$  de l'image :

$$\mu(A) = \int_A d\vec{x} |\nabla I|(\vec{x}) \quad (\text{A.3})$$

La mesure affectée à  $A$  est égale à la somme des variations absolues de l'image sur ce sous ensemble. La mesure  $\mu(A)$  d'un sous ensemble  $A$  de l'image est d'autant plus faible que cette région est homogène en niveau de gris.

L'analyse multi-fractale à l'aide de ce modèle s'intéresse à l'évolution de la mesure  $\mu$  sous les différents types d'échelles afin de singulariser le comportement local de niveau du gris de l'image en chaque pixel  $\vec{x}$ . Pour réaliser cette évaluation multi-échelle, nous utilisons la transformée de l'ondelette où chaque pixel  $\vec{x}$  de l'image peut en effet, être caractérisé par l'évaluation de la mesure  $\mu(B_r(\vec{x}))$  d'une boule  $B$  pour différents rayons  $r$ .

La mesure d'une boule de  $B_r(\vec{x})$  de rayon  $r$  centrée en un pixel  $\vec{x}$  est donnée par :

$$\mu(B_r(\vec{x})) = \int_{B_r} d\vec{v} |\nabla I|(\vec{v}) \quad (\text{A.4})$$

Cette mesure donne une idée de la variabilité locale des niveaux de gris autour du point  $\vec{x}$ .

Cependant, en pratique la boule  $B$  est remplacée par la fenêtre  $w$  de taille  $r$  (le facteur d'échelle) qui peut prendre soit une valeur entière soit une valeur non-entière. Son objectif primordial est d'effectuer une interpolation continue de l'image [TP00a].

Soient  $\mu$  une mesure,  $\psi$ ,  $\vec{x}$  un point de l'image  $I$  et  $r$  un facteur d'échelle de traitement (le facteur de dilatation). La transformée en ondelette continue est donnée par :

$$TO_\psi(\mu(\vec{x}, r)) = \frac{d\mu}{d\vec{x}} \star \psi_r(\vec{x}) = \frac{1}{r^d} \int \psi\left(\frac{\vec{x} - \vec{y}}{r}\right) \cdot |\nabla I|(\vec{y}) d\vec{y} \quad (\text{A.5})$$

Où  $\star$  désigne le produit de convolution, et  $\frac{1}{r^d} \int \psi\left(\frac{\vec{x} - \vec{y}}{r}\right)$  représente la fonction ondelette dilatée d'un facteur d'échelle  $r$  et translatée d'un facteur de translation  $\vec{y}$ .

En effet, si l'ondelette analysante  $\psi$  est bien choisie, la transformée en ondelette de la mesure  $\mu$  montrera un comportement multifractal modélisé de la manière suivante :

$$TO_{\psi}(\mu(\vec{x}, r)) = \mathfrak{s}_{\psi}(\vec{x}) \cdot r^{\alpha(\vec{x})} \quad (\text{A.6})$$

Où  $\alpha(\vec{x})$  est l'exposant de singularités (Hölder) et  $\mathfrak{s}_{\psi}(\vec{x})$  est un coefficient qui dépend uniquement de l'ondelette  $\psi$  et de la mesure  $\mu$ .

Turiel et Parga ont employé différentes ondelettes dans ces recherches et ils ont montré que la meilleur ondelette qui donne le comportement multi-fractale à la mesure  $\mu$  est l'ondelette lorentzienne d'ordre 1 (*cf.* figure A.1) dont l'expression générale est donnée par  $\psi(\vec{x}) = (1 + |\vec{x}|^2)^{-1}$  [TP00a].

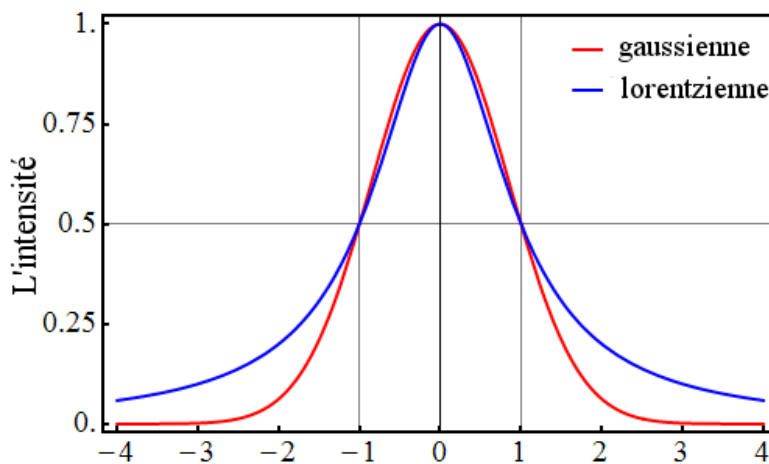


FIGURE A.1 — Allure de l'ondelette lorentzienne par rapport à l'ondelette gaussienne.

## A.2 Exposant de singularité

L'exposant  $\alpha(\vec{x})$  qui apparaît dans l'équation précédente, appelé l'exposant local de singularité, permet de caractériser la structure multi-fractale de l'image.

Soit  $TO_{\psi}(\mu(\vec{x}, r))$  la transformée en ondelettes, utilisant l'ondelette analy-

sante  $\psi$ , de la mesure  $\mu$  au point  $\vec{x}$  et à un facteur d'échelle  $r$ . Les exposants de singularités  $\alpha(\vec{x})$  peuvent être déterminés à partir de l'équation (A.5) par une log-log-régression linéaire au sens des moindres carrés de la manière suivante :

$$\alpha(\vec{x}) = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log(TO_{\psi}(\mu(\vec{x}, r)))}{\log(r)} \quad (\text{A.7})$$

Il est courant de calculer l'exposant de Hölder en tout point  $\vec{x}$  de l'image afin de décrire les signaux chaotiques, caractérisés par une distribution irrégulière des transitions et une invariance d'échelle de la fonction de luminance  $I$  sur l'image.

### A.3 Décomposition en sous-ensembles

Après avoir estimé les exposants de singularités  $\alpha(\vec{x})$  en chaque pixel  $\vec{x}$  de l'image  $I$  en utilisant l'ondelette appropriée  $\psi$ . Les sous-ensembles  $E_{\alpha}$  sont déterminés par :

$$E_{\alpha} \equiv \{\vec{x} \mid \alpha(\vec{x}) \approx \alpha\} \quad (\text{A.8})$$

Ceci permet de regrouper les pixels de l'image selon les caractéristiques locales de la mesure  $\mu$  dans le but de fournir une décomposition multi-fractale où chaque sous-ensemble  $E_{\alpha}$  est un ensemble fractal qui met en évidence la même structure géométrique à différents facteurs d'échelles.

# Alignement-reconstruction simultanée de tomogramme électronique et extraction de volume de ribosome

## Résumé

Ce travail de thèse aborde le problème de l'alignement d'images 2D obtenues en tomographie électronique dans la perspective d'une reconstruction tridimensionnelle et la détection des ribosomes à partir de l'objet reconstruit. Une méthode d'optimisation globale est proposée pour minimiser un coût qui permet d'effectuer l'alignement 3D et la reconstruction de manière conjointe. La thèse traite également le problème de la segmentation des images 3D reconstruites avec une méthode de classification probabiliste. Cependant, la nature des images de cryo-tomographie révèle des problèmes de bruit et de contraste. Deux méthodes de filtrage 3D ont été proposées comme prétraitement du processus de segmentation. La première méthode est basée sur l'intégration fractionnaire. La seconde est basée sur l'analyse multi-fractale. L'institut de recherche biomédicale IGBMC de Strasbourg a fourni les images de projection utilisées dans cette thèse.

**Mots clés :** Tomographie électronique, Orientations erronées, Optimisation, 3D, Analyse multi-fractale, Intégration fractionnaire.

## Abstract

This thesis deals with the problem of the alignment of 2D images obtained by transmission electron microscopy in the perspective of a three-dimensional reconstruction and the detection of ribosomes from the reconstructed object. A global optimization method is proposed to minimize a cost that allows the 3D alignment and reconstruction to be carried out jointly. The thesis also deals with the problem of segmentation of reconstructed 3D images with a probabilistic classification method. However, the nature of cryo-tomography images reveals noise and contrast problems. For this reason, two methods of 3D filtering have been proposed as pre-processing of segmentation, one is based on fractional integration, and the other on a multi-fractal analysis. The institute of biomedical research IGBMC in Strasbourg provides the projection images used in this thesis.

**Keywords:** Electronic Tomography, Incorrect Orientations, Optimization, 3D, Multi-fractal analysis, Fractional integration.