



HAL
open science

Développements méthodologiques et informatiques pour la microscopie électronique en transmission appliqués à des échantillons biologiques

Amandine Verguet

► **To cite this version:**

Amandine Verguet. Développements méthodologiques et informatiques pour la microscopie électronique en transmission appliqués à des échantillons biologiques. Traitement du signal et de l'image [eess.SP]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS487 . tel-02615460

HAL Id: tel-02615460

<https://theses.hal.science/tel-02615460>

Submitted on 22 May 2020

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.

Développements méthodologiques et informatiques pour la microscopie électronique en transmission appliqués à des échantillons biologiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à Université Paris-Sud

Ecole doctorale n°571 Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation
et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 6 décembre 2019, par

AMANDINE VERGUET

Composition du Jury :

Pr Jean Michel Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne, INSERM UMR-S1250, (P3-Cell, Reims)	Président du jury
Pr Ovidiu Ersen Professeur, Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (DSI, Strasbourg)	Rapporteur
Dr Voichita Maxim Maître de Conférences, Créatis (Lyon)	Rapporteuse
Pr José María Carazo Professeur, National Center of Biotechnology (BCU, Madrid)	Examineur
Dr Amélie Leforestier Chercheuse, Laboratoire de Physique des Solides (SOBIO, Orsay)	Examinatrice
Dr Sergio Marco Garrido DR, Sanofi (Lyon)	Directeur de thèse
Régis Ravelle-Chapuis Docteur, JEOL (Europe) SAS (Croissy-sur-Seine)	Co-encadrant
Cédric Messaoudi Docteur, Institut Curie (CMIB, Orsay)	Co-encadrant

Remerciements

Cette thèse a fait l'objet d'une convention CIFRE entre l'entreprise *JEOL (Europe) SAS* et l'unité : *Chimie, Modélisation et Imagerie pour la Biologie de l'institut Curie*.

Je tiens tout d'abord à remercier l'entreprise *JEOL Europe* d'avoir financé ce projet de recherche et d'avoir construit le microscope JEM-2200FS, fabuleuse machine, que j'ai apprivoisée pendant ces trois dernières années.

Je remercie particulièrement Ovidiu Ersen et Voichita Maxim d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit ainsi que pour le temps qu'ils consacreront à sa relecture. Merci également à Amélie Leforestier, Jean Michel et Jose Maria Carazo qui ont accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers mon directeur de thèse Sergio Marco qui m'a initié à la microscopie électronique et m'a proposé cette thèse. Merci de m'avoir accordé ta confiance et ton précieux temps, malgré la distance, pour m'encourager à donner le meilleur de moi-même.

Je remercie également mes co-encadrants Cédric Messaoudi et Régis Ravelle-Chapuis pour leur assistance et leurs conseils. Cédric, merci pour ta sympathie et ton expertise en programmation Java. Régis, merci pour toute l'expérience en microscopie électronique que tu m'as transmise, pour ta disponibilité et tes remarques pleines de bon sens.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes avec lesquelles j'ai collaboré lors de ma thèse. En particulier, Patricia Donnadiou du *laboratoire SIMAP* avec qui j'ai travaillé sur le contraste de phase et qui m'a par ailleurs accordé son temps pour me faire progresser dans la démarche scientifique. Je remercie également Pierrick Leborgne et Michel Lemullos de *l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule* d'avoir partagé leurs échantillons de Paramécie.

Je remercie la direction et les collaborateurs de l'entreprise *JEOL Europe* pour leur accueil, leur grande sympathie, ainsi que les moyens qu'ils ont mis à ma disposition durant cette thèse. Je pense particulièrement à Bruno Achard, Etienne Freyria, Christine Fourny, Guillaume Lathus, Guillaume Brunetti et Nicolas Ravier.

Je tiens aussi à remercier l'équipe *Modélisation et Imagerie Multimodale et multiparamétrique de l'Institut Curie* : Sylvain Trépout, Joël Mispelter, Sandrine Bourgeois, Pascal Rigolet, Eric Qui-niou, Liliane Mouawad, Mihaela Lupu et Antoine Cossa pour tous les échanges et la bonne entente dans l'équipe. Je souhaite remercier plus particulièrement Sylvain pour son aide fréquente, ses nombreux conseils et sa disponibilité. Enfin, je n'oublie pas le soutien que m'a apporté Joël tout au long de cette thèse, les discussions passionnantes sur différents sujets allant de la physique quantique à l'astrophotographie; merci pour l'intérêt porté à mon travail, pour votre implication quotidienne dans la phase finale de ma thèse.

Je remercie également Alexandre et Maurice Bécoulet, Ptissam Bergam, Antoine Cossa, Patricia Donnadiou, Gwenaëlle Lemoine, Sergio Marco, Cédric Messaoudi, Joël Mispelter, Régis Ravelle-Chapuis, Pascal Rigolet et Sylvain Trépout qui se sont proposés spontanément pour contribuer à la qualité de ce manuscrit, pour le temps qu'ils ont consacré à sa relecture, pour leurs nombreuses remarques et corrections.

Enfin, je remercie ma famille pour m'avoir soutenu durant mes études, et particulièrement au cours de cette thèse.

Table des matières

Abréviations	vii
1 Introduction générale	1
1.1 Imagerie et biologie structurale analytique	2
1.2 La microscopie électronique en transmission	2
1.2.1 Microscopie électronique en transmission (TEM) et à balayage en transmission (STEM)	3
1.2.2 Approche spécifique pour la biologie structurale analytique en microscopie électronique en transmission	8
1.3 Le traitement des images en microscopie électronique en transmission	16
1.3.1 Caractéristiques des images numériques en microscopie électronique	16
1.3.2 Images de projection	16
1.4 La reconstruction 3D par tomographie électronique	17
1.4.1 Reconstruction dans l'espace de Fourier	18
1.4.2 Reconstruction itérative	19
1.4.3 Alignement des images	21
1.5 Objectifs de la thèse	26
2 Approche STEM filtrée (Energy filtered-STEM)	29
2.1 Problématique	29
2.2 Approche expérimentale	29
2.3 Résultats	30
2.3.1 Caractérisation des conditions d'acquisition du microscope JEM-2200FS	30
2.3.2 Applications	35
2.4 Conclusion	38
3 Algorithmes de détection de points caractéristiques	39
3.1 Problématique	39
3.2 Approche expérimentale	41
3.2.1 Les différentes étapes du processus	41
3.2.2 Détection de points caractéristiques	41
3.2.3 Appariement entre les points détectés	41
3.2.4 Suivi de points entre les différentes images de la série	42
3.2.5 Alignement et reconstruction 3D	42
3.3 Résultats	43
3.4 Conclusion	48
4 Outils pour le contraste de phase	49
4.1 <i>Phase Plate</i>	49
4.2 La défocalisation, une autre méthode pour exploiter le contraste de phase	54
4.2.1 Problématique	54
4.2.2 Approche expérimentale	55
4.2.3 Résultats	55

4.3	Conclusion et Perspectives	58
5	Développements informatiques pour l'approche RB-STEM	59
5.1	Problématique	59
5.2	Approche expérimentale	59
5.2.1	Acquisition parcimonieuse	60
5.2.2	Restauration des images parcimonieuses	60
5.3	Génération des données parcimonieuses	62
5.3.1	Simulations d'acquisitions	62
5.3.2	Résultat de restauration	63
5.4	Reconstruction multi-échelle	64
5.4.1	Description de MS-SIRT	65
5.4.2	Evaluation	66
5.5	Reconstruction multi-échelle avec alignement intégré	68
5.6	Conclusion	70
6	Conclusion générale et Perspectives	71
	Bibliographie	73
A	Communications liées à la thèse	81
A.1	Publications	81
A.1.1	Livre	81
A.1.2	Articles	81
A.2	Présentations orales	82
A.2.1	Multi-Scale Simultaneous Alignment and Reconstruction : Tool for tomography from full or sparse tilt-series	82
A.2.2	Evaluation of feature based approaches for alignment of tilt series without fiducial markers	83
A.2.3	Energy Filtered STEM evaluation using biological samples	84
A.2.4	Shift and SIFT	84
A.3	Posters	85
A.3.1	Simple Phase Contrast Imaging (SPCI) : An ImageJ tool for TEM	85
A.3.2	Energy Filtered STEM in bright field mode and its evaluation for biological samples	85
A.3.3	An ImageJ plugin for simplified inline holography	85
A.3.4	Methodological and computing development for cryo-STEM tomography of biological sample	85
A.3.5	Evaluation of feature-based registration algorithms for the improvement of tilt-series alignment in electron tomography	85
B	Chapitre 3	
	Article - Comparison of methods based on feature tracking for fiducial-less image alignment in electron tomography	87
C	Chapitre 4	
	Article - An ImageJ tool for simplified post-treatment of TEM phase contrast images	109
D	Chapitre du livre - Cellular Imaging (Electron Tomography and Related Techniques), Hansen Eric, Springer edition	119

Table des figures

1.1	Comparaison des dimensions approximatives des structures biologiques observables	2
1.2	Comparaison des principales lentilles dans un microscope photonique et un TEM	3
1.3	Schéma comparatif de formation de l'image entre un TEM et un STEM	4
1.4	Schéma optique des lentilles condenseurs en mode TEM et en mode STEM	5
1.5	Représentation graphique de la CTF d'un microscope électronique en transmission	6
1.6	Schéma de formation de l'image en mode STEM	7
1.7	Signaux résultant des interactions électron-matière	8
1.8	Synthèse non exhaustive des différents types d'électrons produits lors de l'interaction électron-matière et détecteurs appropriés	8
1.9	Schéma constructeur du JEM-2200FS	9
1.10	Conception schématique de la colonne d'un TEM incluant différents types de <i>phase plate</i> Zernike (ZPP) et Hole Free Phase Plate (HFPP)	10
1.11	Evolution du contraste en fonction du déphasage	10
1.12	Mécanisme de filtre à perte d'énergie <i>in-column</i> et <i>post-column</i>	12
1.13	Application du filtre Oméga sur un échantillon de bactérie hydraté-congelé	13
1.14	Grille de microscopie et <i>cryo-plunge</i>	14
1.15	Porte-objet pour la cryo microscopie et le microscope utilisé	14
1.16	Principe d'acquisition en tomographie électronique	17
1.17	Principe de reconstruction 3D à partir de projections 2D	18
1.18	Application dans l'espace de Fourier du théorème de la section centrale	19
1.19	Principe de la reconstruction itérative	20
1.20	Caractéristiques d'un point d'intérêt détecté avec SIFT	23
1.21	Exemple d'une pyramide de différences de gaussiennes	24
1.22	Création du descripteur pour un point d'intérêt	25
2.1	Angle de convergence et angles de collectes en mode STEM	30
2.2	Différence de phase entre deux électrons par le réseau cristallin d'un échantillon.	31
2.3	Figures de diffraction caractéristiques d'un faisceau convergent sur une structure cristalline	31
2.4	Estimation des angles de convergence pour le microscope <i>JEM-2200FS</i>	32
2.5	Estimation des angles de collectes pour le microscope <i>JEM-2200FS</i>	33
2.6	Acquisition STEM BF avec et sans filtre à perte d'énergie d'un échantillon test	34
2.7	Etude des paramètres optimaux pour des acquisitions STEM BF	34
2.8	Estimation de la vitesse de balayage optimale lors d'acquisition en STEM BF	35
2.9	Test cryo EF-STEM sur des débris biologiques	36
2.10	Reconstruction tomographique de séries d'inclinaisons acquises en STEM <i>bright field</i> sans et avec ajout du filtre en perte d'énergie	37
2.11	Histogramme de deux reconstructions réalisées à partir de séries d'inclinaisons non filtrée et filtrée en énergie	37
3.1	Etapas des différents processus existants d'alignement d'image	40

3.2	Plans XY de reconstructions pour différents algorithmes de détection, avec des niveaux de bruit gaussien constants sur la série	45
3.3	Plans XZ de reconstructions pour différents algorithmes de détection, avec des niveaux de bruit gaussien constants sur la série	45
3.4	Plans XY de reconstructions pour différents algorithmes de détection, avec des niveaux de bruit gaussien aléatoires dans la série	46
3.5	Plans XZ de reconstructions pour différents algorithmes de détection, avec des niveaux de bruit gaussien aléatoires dans la série	47
4.1	Comparaison d'acquisitions TEM, EF-TEM, et phase plate sur une grille en or	50
4.2	Superposition des histogrammes des images acquises dans une région sans échantillon	51
4.3	Analyse de la distribution des histogrammes de la région en l'absence d'échantillon	52
4.4	Comparaison entre 3 acquisitions cryo-TEM de bactériophage T5	53
4.5	Présentation de l'interface utilisateur du plugin SPCI	55
4.6	Interface du plugin SPCI et résultats	56
4.7	Comparaison du traitement SPCI à une image seule avec le filtre passe-bande	57
5.1	Représentation des différents types d'acquisitions parcimonieuses	62
5.2	Simulation de différents motifs d'acquisition parcimonieuse en STEM	63
5.3	Estimation du coefficient de corrélation pour chaque proportion de points collectés entre l'image parcimonieuse restaurée et l'image originale complète	64
5.4	Estimation de l'erreur quadratique moyenne pour chaque proportion de points collectés entre l'image parcimonieuse restaurée et l'image originale complète	64
5.5	MS-SIRT, les étapes de l'algorithme	65
5.6	Plans XY de reconstructions réalisées sur une série d'inclinaisons	68
5.7	SAR, les étapes de l'algorithme	69

La figure 1.9 est issue du manuel utilisateur du microscope JEM-2200FS.

Les dessins de la figure 1.1 ont été réalisés spécialement pour ce manuscrit par Gwenaëlle Lemoine.

Je détiens les droits d'auteur sur tous les autres dessins et schémas présents dans ce manuscrit.

Les images de microscopie électronique en transmission présentées proviennent d'acquisitions réalisées par Sylvain Trépout et moi-même.

Abréviations

ADF	<i>Annular Dark Field</i> : Détecteur annulaire dit de champ sombre
AKAZE	<i>Accelerated KAZE</i>
ART	<i>Algebraic Reconstruction Technique</i>
ASIFT	<i>Affine-SIFT</i>
BF	<i>Bright Field</i> : Détecteur dit de champ clair
BRIEF	<i>Binary Robust Independant Elementary Features</i>
BRISK	<i>Binary Robust Invariant Scalable Keypoint</i>
CLA	<i>Condenser Lens Aperture</i> : Diaphragme condenseur
CSIFT	<i>Colored SIFT</i>
CTF	<i>Contrast Transfer Function</i> : Fonction de transfert de contraste du microscope
DART	<i>Discrete Algebraic Reconstruction Technique</i>
DCT	<i>Discrete Cosine Transform</i>
DoG	<i>Difference of Gaussian</i> : Différences de gaussiennes
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray Spectrometry</i> : Analyse du spectre d'un rayonnement de rayons X
EELS	<i>Electron Energy Loss Spectroscopy</i> : Spectroscopie en perte d'énergie
EF-TEM	<i>Energy Filtered TEM</i> : Imagerie électronique filtrée en énergie
ENTA	<i>Entrance Aperture</i> : Diaphragme d'entrée de filtre
FAST	<i>Feature from Accelerated Segment Test</i>
FEG	<i>Field Emission Gun</i> : Pointe à émission de champ.
Filtre Omega	Filtre <i>in-column</i> présent dans le JEM-2200FS qui sélectionne les électrons selon leur énergie.
FREAK	<i>Fast Retina Keypoint</i>
FT	<i>Fourier Transform</i> : Transformation de Fourier.
GIF	<i>Gatan Imaging Filter</i>
GSIFT	<i>Geometric Scale Invariant Feature Transform</i>
HAADF	<i>High Angle Annular Dark Field</i> : Détecteur annulaire dit de champ sombre (pour les grands angles)
HFPP	<i>Hole Free Phase Plate</i> : plaque de phase <i>Hole Free</i> .
JEM-2200FS	<i>JEOL Electron Microscope 2200FS</i>
KAZE	Méthode de détection permettant l'appariement des points à l'aide d'un descripteur.
LaB₆	Hexaborure de lanthane
MSER	<i>Maximally stable extremal region extractor</i>
OLA	<i>Objectif Lens Aperture</i> : Diaphragme objectif
ORB	<i>Oriented fast and Rotated BRIEF</i>

OS-SART	<i>Ordered Subset-Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique</i>
PCA-SIFT	<i>Principal Components Analysis (PCA) applied to SIFT</i>
RANSAC	<i>RANdom SAmples Consensus</i>
RB-STEM	<i>Random-Beam STEM</i>
SAR	<i>Simultaneous Alignment and Reconstruction</i>
SART	<i>Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique</i>
SI	<i>Spectrum Imaging</i>
SIFT	<i>Scale Invariant Feature Transform</i>
SIRT	<i>Simultaneous Iterative Reconstruction Technique</i>
SNR	<i>Signal to Noise Ratio : Rapport signal sur bruit</i>
SPCI	<i>Simplified post-treatment of TEM Phase Contrast Images</i>
STEM	<i>Scanning Transmission Electron Microscope</i>
SURF	<i>Speed-Up Robust Feature</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscope : Microscope Electronique en Transmission (MET).</i>
TVM	<i>Total Variation Minimisation</i>
ZPP	<i>Zernicke Phase Plate : Plaque de phase de Zernicke.</i>

Il est à noter que certains termes propres à la microscopie et à l'informatique sont en anglais et seront utilisés sous cette forme dans ce manuscrit, car ils n'ont pas d'équivalents en français.

Chapitre 1

Introduction à l'imagerie en microscopie électronique en transmission pour la biologie structurale analytique tri-dimensionnelle

L'essor de la biologie repose fondamentalement sur la description et l'étude des éléments présents dans la nature. Tout à commencé par la classification des espèces animales et végétales, avant que les cellules soient décrites et leurs organites identifiées. Par la suite le développement de la biochimie a permis l'émergence de nouvelles études apportant de précieuses connaissances sur les interactions structure-fonction en explorant les biomolécules et les réactions chimiques les transformant. Ceci a constitué une première étape pour passer d'une biologie descriptive à une biologie structurale. De nos jours, l'étude de la distribution spatiale des éléments chimiques (cartographie chimique) combinée à l'analyse structurale constitue une évolution importante de la biologie analytique.

Les méthodes de cartographie chimique en microscopie électronique actuellement utilisées en biologie sont la spectroscopie de rayon X (EDX *Energy Dispersive X-ray Spectrometry*) ainsi que la spectroscopie de perte d'énergie des électrons (EELS *Electron Energy Loss Spectroscopy*). En EDX les cartographies sont obtenues par microscopie électronique en transmission à balayage (STEM *Scanning Transmission Electron Microscopy*) tandis qu'en EELS les images peuvent être obtenues soit en microscopie électronique en transmission (TEM *Transmission Electron Microscopy*) soit en mode STEM. Avec le mode STEM, la technique est appelée STEM SI pour *Spectrum Imaging* car un spectre EELS est obtenu en chaque point de l'image. Avec le mode TEM, la technique est, quant à elle, appelée EF-TEM SI (*Energy-Filtered TEM Spectrum Imaging*) car chaque image est réalisée à une énergie différente (puisque'elle est filtrée en énergie). Récemment, la méthode EF-TEM et le mode STEM ont été utilisés pour mener des études tridimensionnelles en biologie par des approches tomographiques (Da Cunha et al., 2016; Midgley and Weyland, 2003). Ceci a ouvert les portes de la biologie structurale tridimensionnelle à la chimie analytique. Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans l'adaptation et l'optimisation de ces développements pour la biologie structurale analytique.

1.1 Imagerie et biologie structurale analytique

La sensibilité des échantillons à la dose d'électrons reçue lors des acquisitions limite pour l'instant l'usage de la microscopie électronique tridimensionnelle analytique à l'ultra-structure cellulaire. En effet, l'observation de protéines ou de structures biologiques d'une taille de quelques nanomètres, nécessite l'utilisation de grossissement important ($> \times 50\,000$). Dans ce cas l'échantillon reçoit un flux d'électrons ($e^-/\text{Å}^2$)¹ proche de la limite qu'il peut typiquement supporter sans dommages.

Lors de l'acquisition on ne capte qu'une fraction des électrons traversants l'échantillon. Afin d'obtenir une image exploitable, la dose d'électrons appliquée devrait être augmentée, ce qui est impossible sur des échantillons fragiles. Ceci complique la production d'images exploitables alors que la dose d'électrons reçue par l'échantillon est limitée. Pour reconstruire une représentation tridimensionnelle de l'échantillon, les méthodes tomographiques nécessitent l'acquisition de plusieurs images du même échantillon, ce qui accentue d'avantage le problème de dose.

Les développements les plus récents en tomographie analytique sont liés à la cartographie chimique 3D utilisant une méthode d'imagerie filtrée en énergie en TEM (EF-TEM) (Messaoudi et al., 2013), ainsi qu'à l'utilisation du mode STEM en contraste atomique (Midgley et al., 2006). Une nouvelle approche en microscopie sera explorée ici en combinant les méthodes d'acquisition EF-TEM et STEM (chapitre 2). De plus, afin de contribuer au développement de la microscopie électronique pour la biologie structurale analytique, la problématique d'alignement des images en tomographie sera abordée dans le chapitre 3 de cette thèse.

1.2 La microscopie électronique en transmission

En biologie, la microscopie électronique en transmission constitue le prolongement des outils donnant accès à l'observation de structures non observables par l'oeil humain (figure 1.1). En effet, après les loupes, les macroscopes et les microscopes photoniques, le TEM s'est progressivement imposé comme une technique de choix applicable à l'observation de structures biologiques. Elle permet, en effet, l'observation de structures périodiques ou non et dont l'échelle peut descendre jusqu'à quelques angströms (0.1 nm).

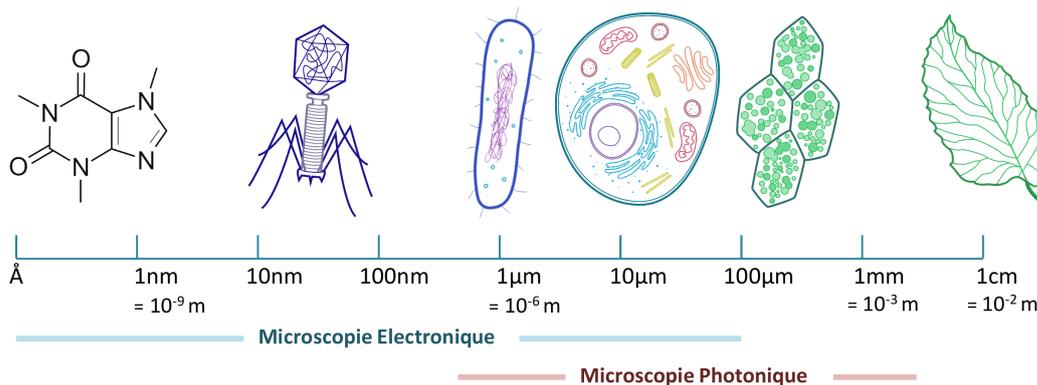


FIGURE 1.1 – Comparaison des dimensions approximatives des structures biologiques observables en microscopie photonique (cellules végétales, animales et tissus) et en microscopie électronique en transmission (cellules eucaryotes, bactéries, virus et macromolécules)

Différents modes d'observation se sont développés en microscopie électronique en transmission, telle l'imagerie électronique en énergie filtrée (EF-TEM), ou encore la focalisation du faisceau d'électrons qui permet de former une image en balayant l'échantillon (STEM).

1. L'unité du système international est le nanomètre cependant l'angström qui correspond à 10⁻¹⁰ m sera également utilisé comme unité dans cette thèse.

1.2.1 Microscopie électronique en transmission (TEM) et à balayage en transmission (STEM)

Dans les sections suivantes, les principes de la microscopie électronique en transmission (TEM) et à balayage (STEM) appliqués à la biologie seront brièvement rappelés. Les notions abordées sont issues d'ouvrages de référence (Pennycook and Nellist, 2011; Reimer and Kohl, 2008; Williams and Carter, 2009).

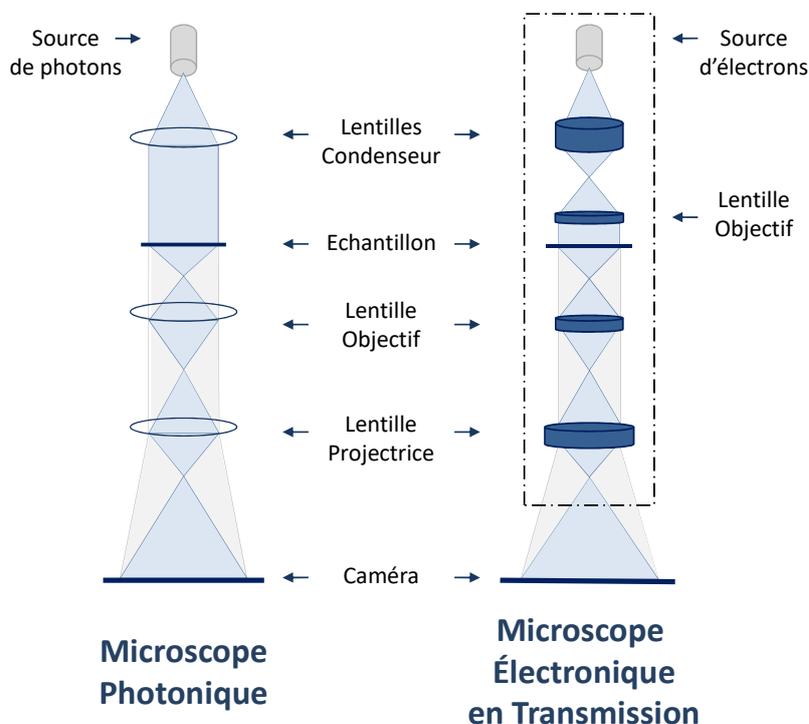


FIGURE 1.2 – Schéma simplifié permettant de comparer les principaux jeux de lentilles présents dans un microscope photonique avec ceux d'un TEM. On peut observer leur forte similarité, excepté leurs sources d'émission (photon ou électron) et la présence de vide dans la colonne d'un microscope électronique en transmission. Le vide est de 10^{-9} Torr au niveau de la source d'électrons.

Les images en microscopie électronique en transmission sont obtenues à partir d'électrons accélérés à des tensions variant en général entre 80 et 300 kV. Suite aux interactions avec la matière, plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'acquisition de différents types d'informations (images ou spectres). Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux propriétés corpusculaires des électrons qui permettent d'obtenir des images de projection lorsqu'ils traversent un échantillon. On peut ainsi distinguer deux grands modes d'acquisition :

- Le premier mode, TEM, est le plus ancien. Il a été mis au point en 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska (Lambert and Mulvey, 1996) et présente des similitudes avec les microscopes photoniques. Il se base sur le fait qu'un électron peut être dévié par des lentilles électromagnétiques qui jouent le même rôle que celui des lentilles en verre dans un microscope photonique. L'échantillon est éclairé par un faisceau parallèle d'électrons permettant ainsi l'acquisition de tous les points de l'image simultanément. L'image de projection est ensuite formée par les lentilles (Figure 1.2).
- Le second mode, STEM, a quant à lui été proposé pour la première fois en 1937 par Von Ardenne (von Ardenne, 1938). Cependant, son application à la biologie reste récente. Ainsi, il a été utilisé pour la première fois en 1970 pour l'observation, entre autres, de bactériophages (Crewe and Wall, 1970). Il est basé sur le même principe que le TEM. Cependant, les électrons convergent en un seul point en STEM alors que le faisceau est parallèle en TEM. L'image de projection est obtenue par le balayage de ce faisceau convergent. Elle est formée

point par point à partir des électrons transmis. Le faisceau convergent obtenu est couramment appelé « sonde » et son diamètre à mi-hauteur correspond à sa « taille ».

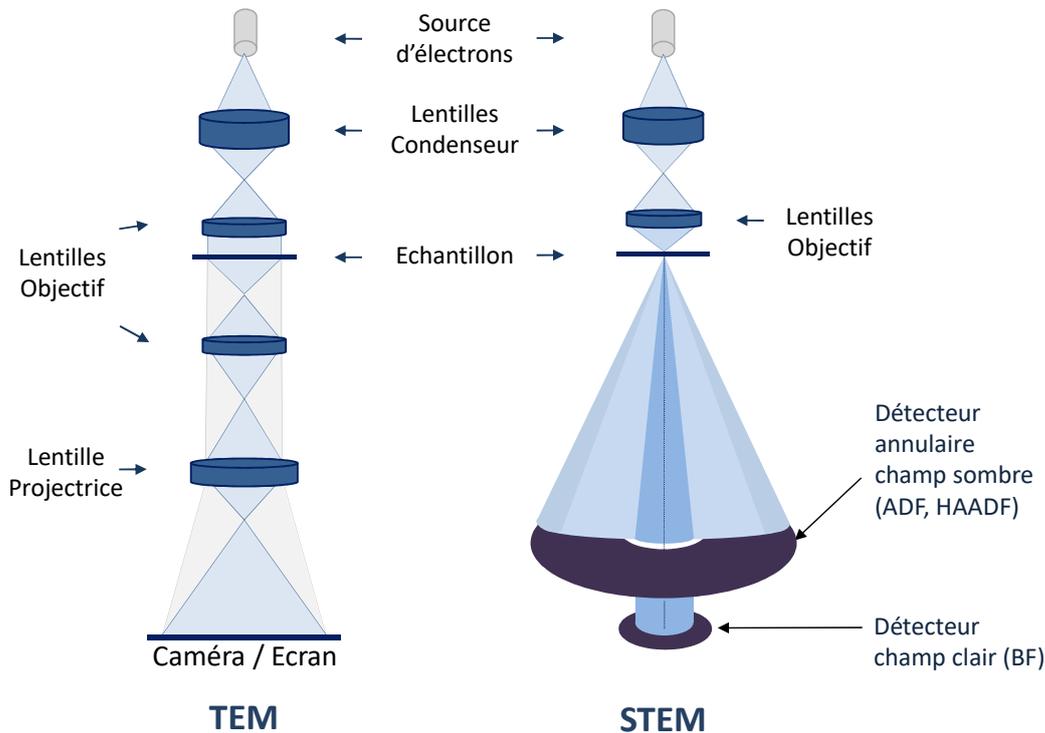


FIGURE 1.3 – Schéma comparatif de formation de l'image entre un TEM et un STEM. Dans le cas du TEM, les électrons atteignent l'échantillon sous forme d'un faisceau parallèle large, alors qu'en STEM les électrons convergent en un point (sonde) sur l'échantillon. En STEM, la lentille objectif présente sous l'échantillon n'est pas utilisée. Contrairement à une lentille en verre, une lentille magnétique peut être désactivée.

Le système optique et la formation des images

Un microscope électronique en transmission est constitué d'une source d'électrons, d'un accélérateur porté à une haute tension, de plusieurs jeux de lentilles électromagnétiques jouant les rôles de condenseur, d'objectif et de projecteur (figure 1.3). La source peut être un filament de tungstène, d'hexaborure de lanthane (LaB_6) ou une pointe à émission de champ (FEG). Des déflectrices permettent d'aligner le faisceau d'électrons et de corriger l'astigmatisme.

En TEM, le système de lentilles condenseurs produit un faisceau électronique parallèle qui illumine l'ensemble de la zone étudiée, alors qu'en STEM ces mêmes lentilles condenseurs sont excitées de façon différentes afin de réaliser une sonde fine sur l'échantillon. La figure 1.4 présente les deux modes de fonctionnement des lentilles condenseurs en mode TEM et STEM.

Le contraste en TEM

En TEM, tous les points de l'image sont formés simultanément par la lentille objectif. Cette image possède un grandissement assez faible. Elle est donc agrandie par les lentilles du système projecteur et peut ensuite être visualisée sur écran ou enregistrée sur différents supports (anciennement film photographique, et maintenant capteur électronique).

Le contraste de l'image est lié à la densité électronique de la matière traversée. En biologie, sur des échantillons ayant été préparés avec des produits de contraste contenant des sels de métaux lourds (acétate d'uranyl, citrate de plomb, molybdate d'ammonium...), l'image présente principalement un contraste d'amplitude. Une limitation importante de cette approche est l'observation de l'*empreinte* de l'échantillon, en raison des métaux lourds opaques aux électrons se déposant

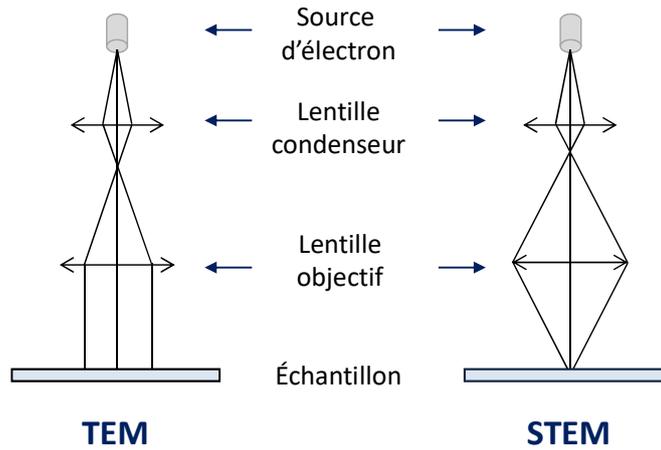


FIGURE 1.4 – Schéma optique des lentilles condenseurs en mode TEM et en mode STEM

autour de celui-ci. A l'inverse, les échantillons biologiques composés d'atomes légers sont transparents, ce qui conduit à une coloration négative. Ainsi, on n'observe pas directement la structure de l'échantillon mais on la déduit de son empreinte. De plus, la présence d'un vide important dans le microscope n'offre pas la possibilité d'observer les échantillons en phase liquide, or les échantillons biologiques dans leur état natif sont principalement constitués d'eau. Pour contourner ces limitations, il est nécessaire d'utiliser une autre méthode de préparation : la vitrification où l'échantillon est dans un état solide hydraté (Dubochet and Lepault, 1984) obtenu par un processus de congélation rapide (vitrification). Le processus est détaillé par la suite.

Dans ce cas, le contraste de l'image résulte du déphasage des électrons ayant traversé l'échantillon. Ce contraste de phase dépend du terme Δz de la fonction de transfert de contraste (CTF) qui prend aussi en compte l'aberration sphérique C_s due aux imperfections des lentilles (fonction (1.1)). Cette fonction exprimée dans l'espace de Fourier est formulée comme suit :

$$T(q, \Delta z) = \exp(-i\chi(q)) = \exp\left(i\left(-\left(\frac{\pi C_s \lambda^3}{2} q^4 + \pi \lambda \Delta z q^2\right)\right)\right) \quad (1.1)$$

où λ est la longueur d'onde des électrons, Δz , la valeur de défocalisation de la lentille objectif, C_s , le coefficient d'aberration sphérique de la lentille objectif et q correspond à la distance dans le réseau réciproque.

La CTF indique comment les fréquences spatiales vont être transférées par la lentille objectif. La figure 1.5 illustre les variations de la fonction de transfert en fonction de la distance dans le réseau réciproque. On remarque que selon la défocalisation, certaines échelles de détails sont plus ou moins transmises. Au delà d'une certaine distance, l'information n'est plus transmise. En découle la notion de limite d'information. La limite d'information est de l'ordre de 0.1 nm (soit 1Å) pour un microscope équipé d'un canon FEG (Field Emission Gun). L'allure de la CTF, notamment la position des zéros de cette fonction sur la courbe, dépend de la valeur de défocalisation Δz . Ceci implique que le contraste des images et leurs détails (donc leur résolution) vont dépendre de cette valeur. La défocalisation dite de Scherzer correspond à la meilleure résolution ponctuelle possible sur le microscope mais elle n'est pas forcément atteignable pour tous les échantillons. La résolution ponctuelle est couramment de l'ordre de 0.2 à 0.3 nm suivant le coefficient d'aberration de la lentille objectif C_s et de la tension utilisée. Cette dernière influence directement la longueur d'onde du faisceau d'électrons λ donnée par l'équation (1.2) suivante :

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 eV \left(1 + \frac{eV}{2m_0 c^2}\right)}} \quad (1.2)$$

où λ est la longueur d'onde (en nm), h est la constante de Planck, m_0 la masse de l'électron au

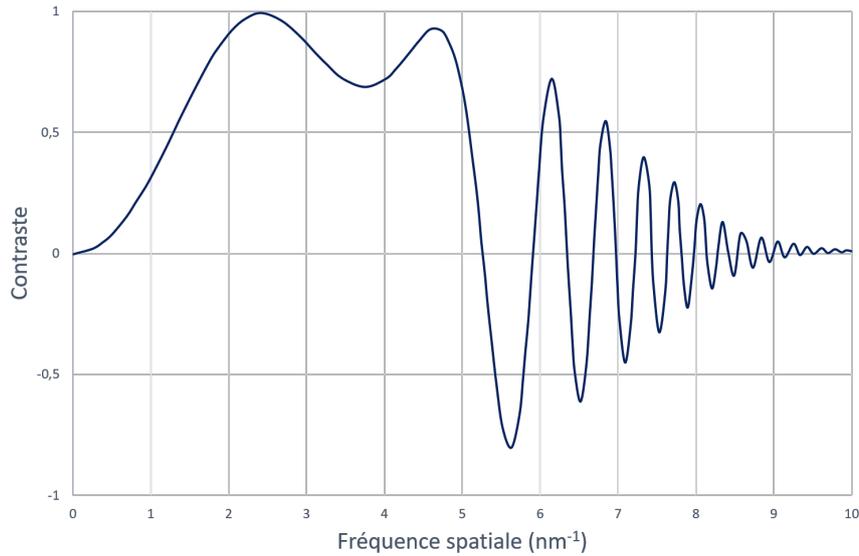


FIGURE 1.5 – Représentation graphique de la CTF d'un microscope électronique en transmission. La courbe de la fonction de transfert a été simulée avec le logiciel *ctfexplorer*, elle correspond à celle d'un microscope TEM de 200 kV avec une défocalisation de 100 nm et un Cs de 1.2 nm.

repos, c est la vitesse de la lumière, e la charge de l'électron et V la tension en volt (200 kV dans notre cas). Soit :

$$\lambda = \sqrt{\frac{1.5}{V}} \quad (1.3)$$

où V est la tension d'accélération en Volt et λ , la longueur d'onde en nm.

Il est à noter que l'équation 1.3 est une approximation de l'équation 1.2 dans laquelle on néglige la correction relativiste, ce qui conduit à une valeur λ de 2.74 pm (équation 1.3) contre 2.508 pm (équation 1.2).

Le contraste en STEM

En STEM, le faisceau d'électrons se focalise en un point sur l'échantillon avec un certain angle appelé angle de convergence (figure 1.6). Une fois les électrons transmis, les détecteurs reçoivent les électrons selon un angle appelé angle de collecte (*collection angle*) (figure 1.6). Chaque point de l'échantillon est balayé par une sonde ponctuelle qui est à l'origine des signaux recueillis par les détecteurs situés sous l'échantillon. L'image est alors formée point par point et son contraste va dépendre des interactions en chaque point de balayage, de l'angle de convergence, du détecteur utilisé ainsi que de son angle de collecte.

Il existe plusieurs types de détecteurs. Le détecteur dit de champ clair (BF, *Bright Field*) collecte en chaque point les électrons transmis sans déviations. En revanche, les détecteurs dits de champ sombre annulaire (ADF pour *Anular Dark Field* et HAADF pour *High Angle Anular Dark Field*) collectent quant à eux les électrons diffusés à des angles moyens et grands, respectivement. De façon générale en biologie, le contraste en STEM dépend de la nature chimique (numéro atomique) des éléments composants l'échantillon. Dans le cas du STEM BF, ce contraste est très sensible à l'épaisseur traversée. En STEM HAADF, le contraste des images dépend, quant à lui, du numéro atomique des éléments.

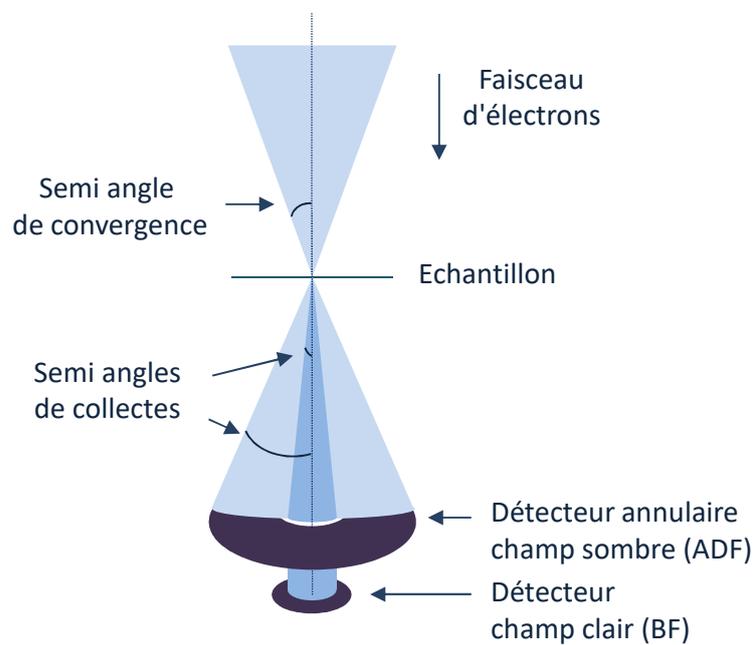


FIGURE 1.6 – Schéma de formation de l'image en mode STEM. Le faisceau incident converge sur un point de l'échantillon avec un angle donné (angle de convergence), après interaction avec celui-ci les électrons sont captés par différents types de détecteurs (BF, ADF, HAADF) dépendant de l'angle de diffusion utilisé.

1.2.2 Approche spécifique pour la biologie structurale analytique en microscopie électronique en transmission

Comme indiqué sur la figure 1.7, l'interaction électron-matière produit de nombreuses émissions secondaires qui peuvent être utilisées pour former des images. Il faut pour cela que le microscope soit équipé de détecteurs accompagnés d'optiques électronique appropriée, tels que :

- des détecteurs d'électrons transmis en directs (BF) ou diffusé (ADF, HAADF) pour la formation des images STEM (contraste atomique),
- des détecteurs de rayons X (spectroscopie EDX),
- mais aussi des spectromètres en énergie filtrée pour les électrons inélastiquement diffusés (EELS, EF-TEM).

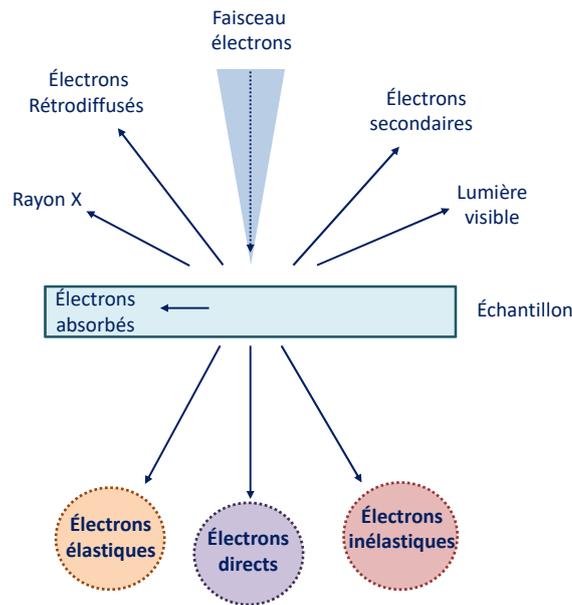


FIGURE 1.7 – Schéma des signaux résultant d'interactions entre les électrons et les échantillons ainsi que leurs relations avec les différents modes d'imagerie en microscopie électronique en transmission

Détecteurs Types d'émission	TEM	STEM BF	STEM ADF	STEM HAADF	EELS
Électrons Transmis	✓	✓			
Électrons élastiques	✓	✓	✓	✓	✓
Électrons inélastiques				✓	✓

FIGURE 1.8 – Synthèse non exhaustive des différents types d'électrons diffusés lors des collisions avec la matière (atomes), et détecteurs appropriés

Dans le cadre de cette thèse, on s'intéressera à l'imagerie STEM-BF en la combinant à l'imagerie filtrée à perte d'énergie (EF-TEM). L'imagerie EF-TEM est obtenue grâce au filtre *in-column* présent dans le microscope JEM-2200FS dont notre laboratoire est équipé. Un autre dispositif appelé *phase plate* a en outre été installé dans ce microscope fin 2018. Il permet d'obtenir un nouveau type d'image TEM. Nous nous intéresserons dans la suite de ce document (chapitre 4) à sa caractérisation sur des échantillons biologiques.

Structure du JEOL Electron Microscope 200kV Filtré (JEM-2200FS)

Le microscope à émission de champ 200kV (JEM-2200FS) utilisé durant ma thèse combine les différentes caractéristiques décrites dans ce chapitre. Il est équipé d'un filtre oméga à perte d'énergie et d'un détecteur STEM. Le schéma constructeur du microscope est présenté dans la figure 1.9. Une *phase plate* de type HFPP, pour *Hole Free Phase Plate*, placée au niveau du diaphragme objectif (non représentée sur la figure) a été installée au cours de la dernière année de ma thèse.

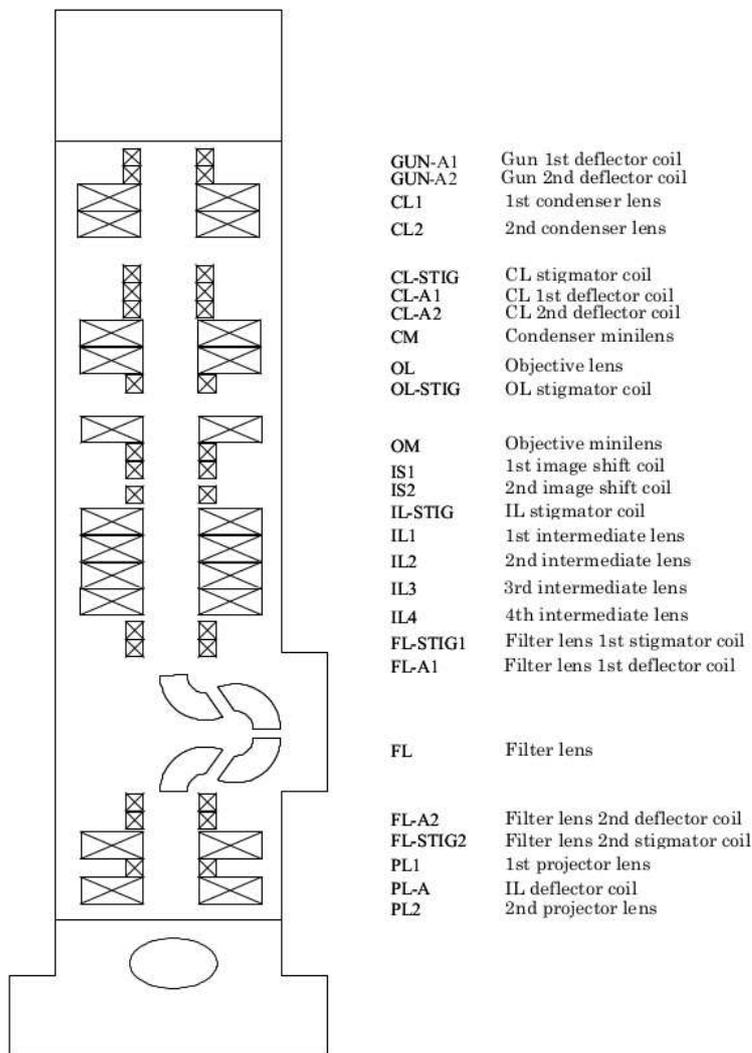


FIGURE 1.9 – Schéma constructeur du JEM-2200FS provenant du manuel d'utilisation du microscope

Phase Plate

Une phase plate est un composant introduit dans la colonne du microscope afin d'engendrer un déphasage entre les électrons directs et les électrons diffusés. Lorsque l'état natif de l'échantillon biologique est conservé par une méthode de cryo-congélation la contribution du contraste de phase servant à former les images est faible. Classiquement, pour augmenter ce contraste, on a recours à la défocalisation. Cependant, les phase plates apportent de nouvelles possibilités d'augmentation du contraste qu'il serait intéressant de comparer aux méthodes de défocalisation.

Ces dispositifs, développés durant la dernière décennie, sont considérés comme récents dans le monde de la microscopie électronique. Cependant, la première phase plate a été inventée pour l'imagerie photonique, par Zernike dans les années 40 (Zernike, 1942). La phase plate de Zernike (ZPP) est constituée d'une membrane munie d'un trou central qui laisse passer uniquement le

faisceau transmis lorsque la membrane est insérée dans le plan focal de la lentille objectif (figure 1.10).

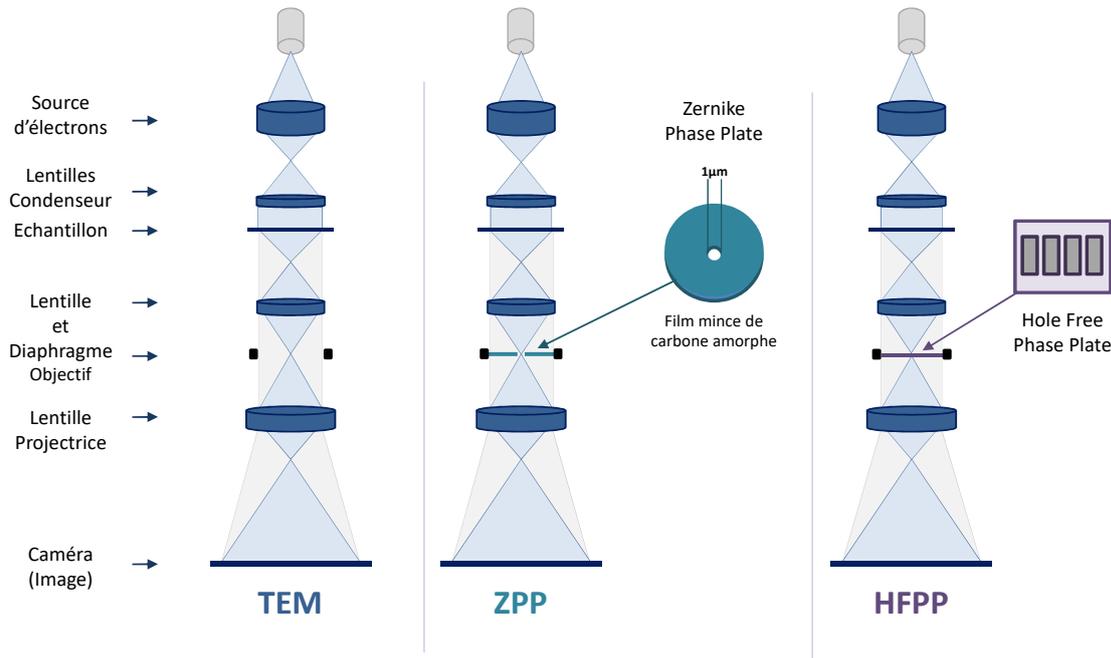


FIGURE 1.10 – Conception schématique d'une colonne d'un TEM incluant différents types de *phase plate* Zernike (ZPP) et Hole Free (HFPP)

Les électrons diffusés traversent une membrane et subissent un déphasage qui dépend de son épaisseur. Comme on l'a vu précédemment, le transfert de contraste de la lentille objectif s'exprime par la fonction (1.1). La présence d'une phase plate revient à ajouter un terme de phase à cette fonction. Dans le cas où le déphasage est de $\pi/2$ dans la CTF, la fonction cosinus correspond à un sinus et inversement. Dans une approche simplifiée, où l'on néglige le déphasage lié à l'aberration sphérique C_s et à la défocalisation, pour deux points de l'échantillon caractérisés par des déphasages locaux ϕ_1 et ϕ_2 , le contraste entre ces points est relié à la différence $\sin(\phi_1) - \sin(\phi_2)$ en présence d'une phase plate. En l'absence de phase plate, le contraste est relié à la différence $\cos(\phi_1) - \cos(\phi_2)$. Pour des déphasages ϕ_1 et ϕ_2 faibles on peut considérer que $\sin(\phi_1) - \sin(\phi_2) \approx \phi_1 - \phi_2$, alors que $\cos(\phi_1) - \cos(\phi_2) \approx 0$. Autrement dit, la différence de contraste est plus importante au voisinage de $\pi/2$, tel que mis en évidence sur la figure 1.11.

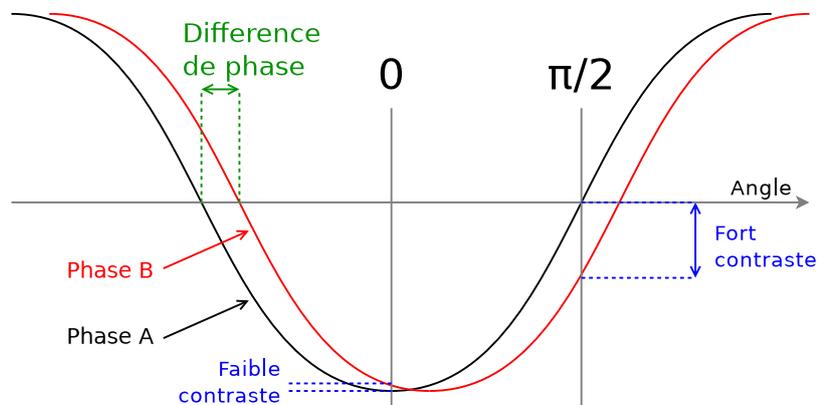


FIGURE 1.11 – Evolution du contraste en fonction du déphasage

En pratique un contraste satisfaisant peut être obtenu avec des valeurs de déphasage dû à la phase plate comprise entre $\pi/4$ et $3\pi/4$ (Danev and Nagayama, 2011). La ZPP est toutefois délicate d'utilisation, en raison de la précision nécessaire au positionnement du faisceau d'électrons dans

un trou d'un diamètre potentiellement inférieur au micron.

Pour tenter de contourner cette limitation, d'autres types de phase plate assurant un rôle similaire ont vu le jour plus récemment. De par leur conception, plusieurs modèles ont été développés allant des films minces (Danev et al., 2014; Nagayama and Danev, 2008), à des dispositifs électrostatiques (Frindt et al., 2014; Matsumoto and Tonomura, 1996) ou encore magnétiques (Edgcombe et al., 2012). A ce jour, trois modèles de phase plate sont majoritairement utilisés :

- la *Zernicke phase plate*, précédemment décrite, est composée d'un film mince de carbone amorphe d'environ 20 nm d'épaisseur, percé d'un trou placé dans le plan focal image de la lentille objectif (Danev et al., 2009). Le faisceau d'électrons passe par le trou central tandis que les électrons diffusés sont déphasés de $\pi/2$ (Danev and Nagayama, 2001). En raison de sa contamination continue, elle présente le désavantage d'avoir une durée de vie d'environ une semaine avec ou sans utilisation. De plus, elle n'est pas facilement automatisable. Enfin, un trou mesurant environ 1 micron induit le même effet que celui d'un diaphragme objectif de très petite taille.
- Les *phases plates* Volta et Hole Free (figure 4.1) sont toutes deux constituées d'un film mince d'un matériau amorphe particulier, d'une épaisseur comprise entre 10 et 20nm, qui est chauffé afin d'éviter toute contamination. Après la traversée de cette phase plate, on observe un déphasage entre les électrons directs et les électrons diffusés. A l'inverse de la ZPP, ces phase plates ne présentent pas de trou central. Différents effets sont évoqués pour expliquer ce phénomène de déphasage. Il s'agirait de modifications de la surface induites par les radiations qui seraient combinées à des modifications de l'équilibre chimique de la membrane sous vide (Danev et al., 2014; Marko et al., 2016). En effet, le phénomène permettant son fonctionnement n'est pas encore bien compris.

Imagerie des électrons filtrés en énergie (EF-TEM)

Les interactions des électrons traversant l'échantillon peuvent être classées en deux catégories :

- Les électrons inélastiques, associées à une diffusion à des angles faibles,
- Les électrons élastiques, liés à une diffusion à de plus grands angles et associés à une perte d'énergie caractéristique à la nature chimique des éléments composant l'échantillon.

A l'aide d'un champ magnétique, on peut réaliser des spectromètres capables de visualiser et de mesurer ces pertes d'énergie. En microscopie électronique en transmission, il existe deux types de spectromètres selon qu'ils sont localisés à l'intérieur ou en dehors de la colonne. Le filtre *in-column* se trouve entre la lentille objectif et la lentille de projection (filtre Oméga) comme le montre la figure 1.12 A, alors que le filtre *post-column* GIF (*Gatan Imaging Filter*) est positionné après la dernière lentille de projection (figure 1.12 B).

Ces spectromètres jouent le rôle équivalent à un prisme qui disperse la lumière. Ils peuvent être utilisés afin d'obtenir le spectre de perte d'énergie qui présente des discontinuités (appelées seuils) caractéristiques des éléments chimiques. Si on dispose une fente de sélection à la sortie du spectromètre, selon la position et la taille de la fente, on ne laisse passer que les électrons ayant subi une perte caractéristique d'énergie. L'image TEM alors formée à partir de ces électrons filtrés (image EF-TEM) permet de visualiser les zones riches en éléments correspondants à cette perte donnée. Par ailleurs, la fente de sélection peut également être centrée pour sélectionner les électrons à perte d'énergie nulle.

L'image formée dans le dernier cas est appelée *zero-loss*. Son contraste est augmenté en raison de la filtration des électrons inélastiques produits lors d'une ou plusieurs interactions avec la matière. Sachant que les échantillons biologiques ne sont pas constitués d'une monocouche atomique, mais présentent une hétérogénéité, étant majoritairement composés d'hydrogène (H), de carbone (C), d'oxygène (O) et d'azote (N); la probabilité d'obtenir des interactions multiples conduisant à la génération d'électrons inélastiques est très élevée. Les images en *zero-loss* sont dès lors d'un grand intérêt en biologie.

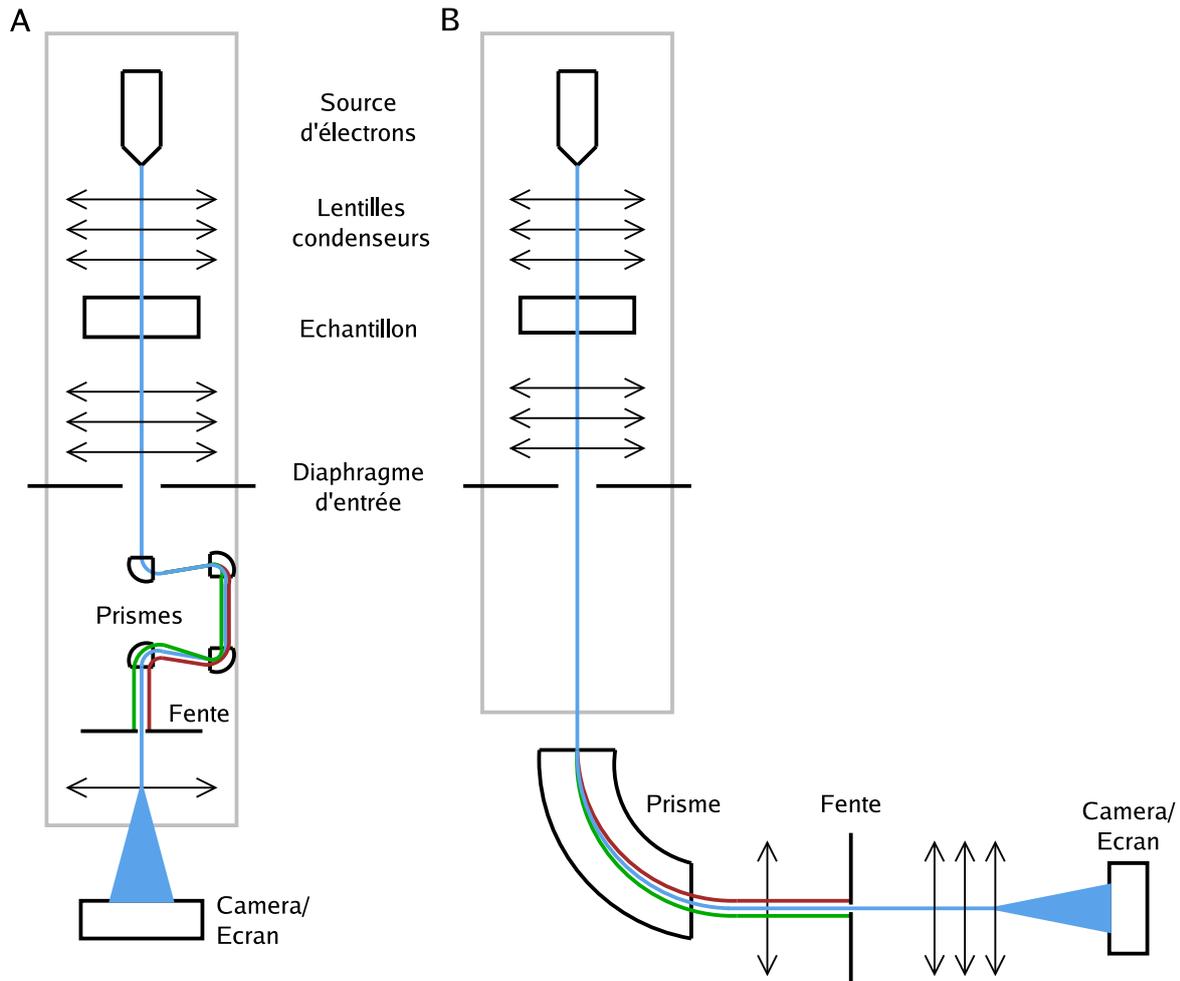


FIGURE 1.12 – Mécanisme de filtre à perte d'énergie *in-column* et *post-column*. Le filtre *in-column* est également appelé filtre Oméga de par sa forme.

La figure 1.13 présente une application du filtre Oméga. L'image 1.13 A a été acquise en TEM dans des conditions standards et le spectre 1.13 C montre la distribution des différentes énergies associées. Cette même zone est ensuite représentée avec l'application d'une fente d'une taille de 20 eV lors de l'acquisition (figure 1.13 B). En filtrant entre -10 eV et 10 eV, on élimine la contribution inélastique (figure 1.13 D) (Colliex et al., 2016). Cette méthode est particulièrement simple à réaliser avec un filtre *in-column* car elle ne nécessite de positionner qu'une fente de sélection lors de la réalisation de l'image en mode TEM sans aucun réglage additionnel.

Dans certaines conditions d'illumination et de réglage du filtre, on peut réaliser des images STEM filtrées en énergie. La combinaison de ces deux méthodes fera l'objet d'un développement spécifique présenté dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Cette nouvelle méthode a l'intérêt d'augmenter à la fois le contraste en utilisant l'imagerie *zero-loss* et de réduire la dose reçue localement par l'échantillon grâce au balayage STEM.

Préparation et observation d'un échantillon biologique en TEM

La microscopie électronique en transmission est un outil permettant l'observation de la structure d'un échantillon biologique. L'observation se déroule sous vide et sous un faisceau d'électrons, ce qui nécessite une préparation de l'échantillon en amont. En effet, un échantillon biologique est majoritairement composé d'eau (environ 70%), ce qui est incompatible avec une observation sous vide. De plus, l'échantillon doit présenter une faible épaisseur (entre 60 et 300nm) afin qu'un nombre suffisant d'électrons puisse le traverser et former ainsi une image.

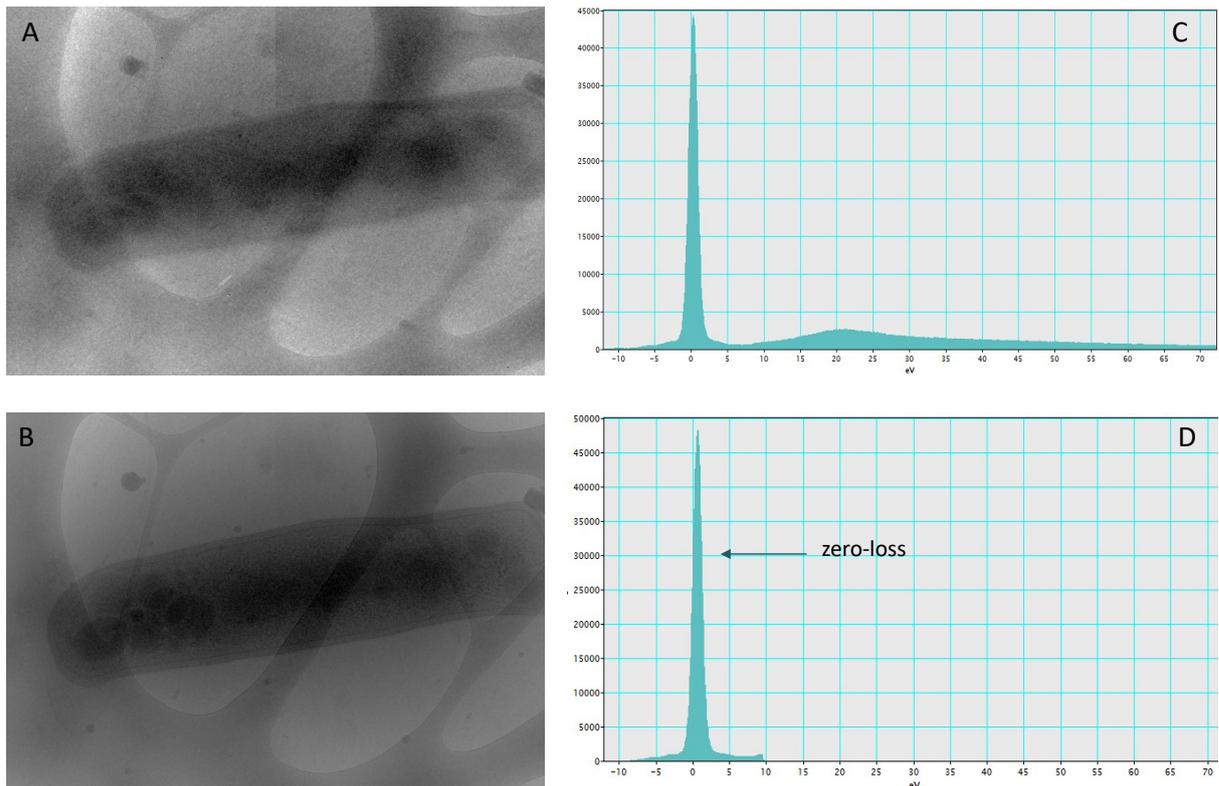


FIGURE 1.13 – Exemple d’application du filtre Oméga (*in-column*) sur un échantillon de bactérie hydratée-congelé. L’image (A) est une image non filtrée acquise en TEM et l’image (B) est l’image équivalente acquise en TEM filtrée à 0eV par l’introduction de la fente. Les figures C et D correspondent aux spectres en énergie respectifs des images A et B. Les images ont été acquises à un grandissement de $\times 10\ 000$ avec un temps d’exposition de 0.5 s par image.

Classiquement en microscopie électronique, des techniques telles que la coloration négative et l’inclusion en résine permettent l’observation des échantillons biologiques, cependant, la structure native de l’échantillon n’est pas conservée par ces techniques. Depuis la fin des années 80, Jacques Dubochet a permis, au travers de ses travaux sur le développement de la cryo-microscopie, l’observation d’échantillons biologiques hydratés dans leur état natif (Dubochet et al., 1988) (Prix Nobel de Chimie 2017).

La cryo-fixation par immersion (*Plunge freezing*)

La méthode de *plunge freezing* consiste à placer une suspension aqueuse sur une grille de cuivre recouverte d’un film de carbone troué rendu hydrophile. Ces trous permettent de suspendre l’échantillon afin que seul celui-ci soit observé. Une fois l’échantillon déposé sur la grille, l’excédant est retiré avec du papier filtre afin de ne laisser qu’une couche mince de liquide. La grille est ensuite plongée dans un bain d’éthane liquide refroidi par de l’azote liquide à une température inférieure à 180°C (figure 1.14). Le principe est d’abaisser très rapidement la température de l’échantillon afin d’atteindre un état solide sans cristaux (glace amorphe). Cet état vitreux conserve l’état natif de l’échantillon sans séparation de phase.

La grille est ensuite placée sur un porte-objet cryo (figure 1.15) refroidi à l’azote liquide afin de maintenir l’échantillon à une température suffisamment basse pour éviter la formation de cristaux. Il est ensuite inséré dans le cryo-microscope sous vide préalablement refroidi, à la température de l’azote liquide, afin d’être observé et imagé. Il est très important de préserver la chaîne du froid durant toute la procédure afin d’empêcher la cristallisation de la glace.

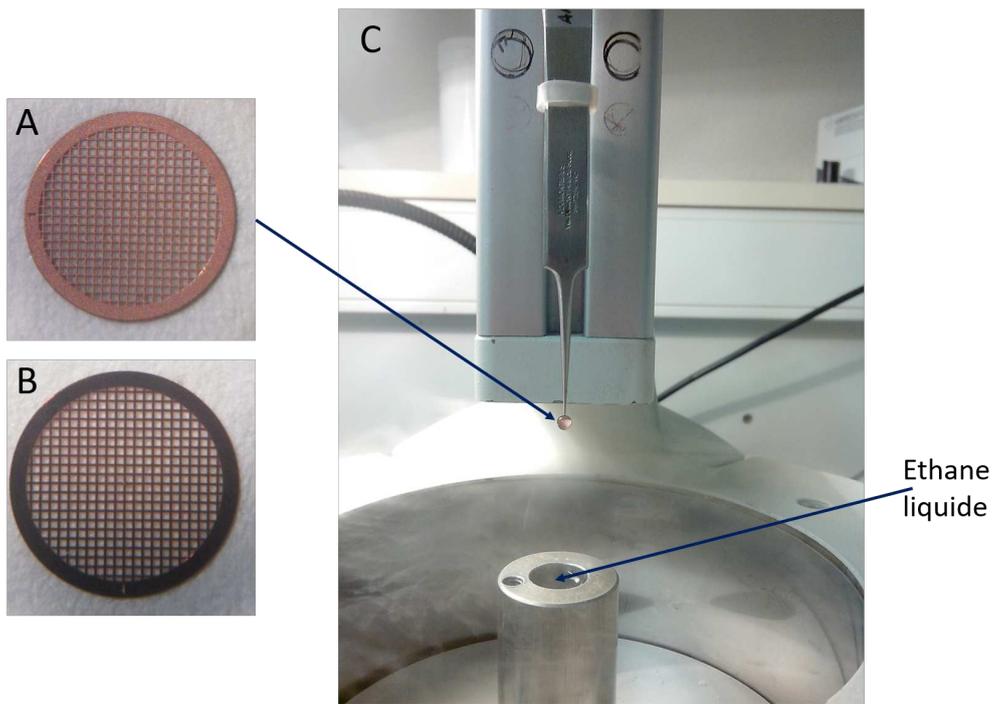


FIGURE 1.14 – Visualisation recto (A) et verso (B) d'une grille de cuivre de 3 mm de diamètre, recouverte d'un film de carbone. Une fois rendue hydrophile, on peut y déposer une goutte contenant l'échantillon à étudier (C). Après absorption du surplus d'eau, on plongera l'échantillon dans l'éthane liquide (C).

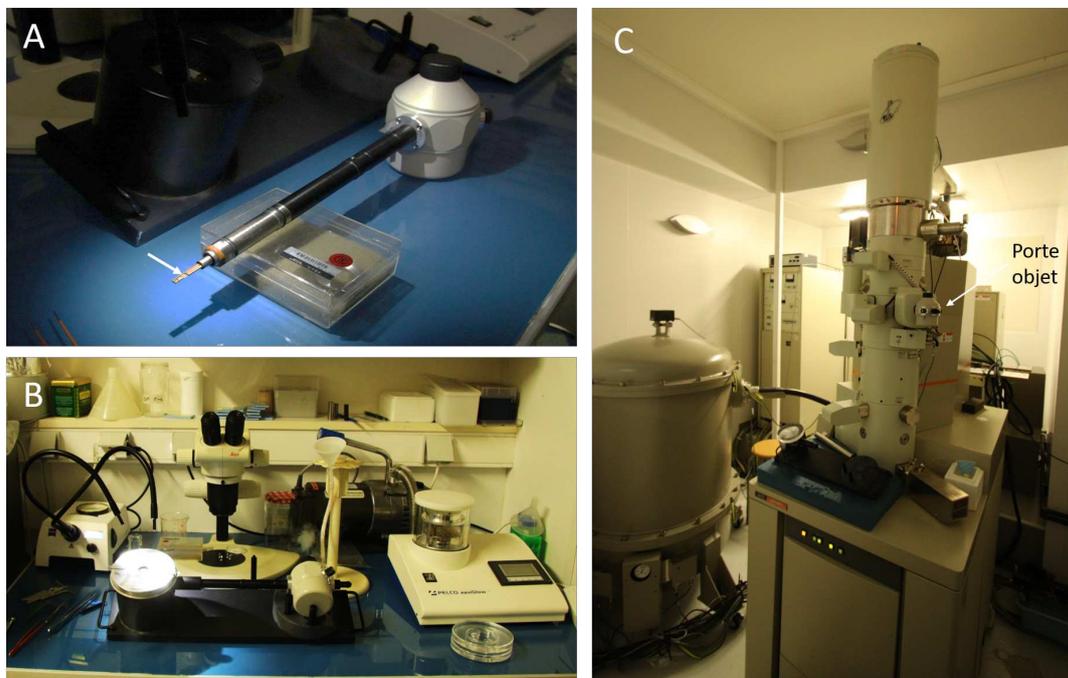


FIGURE 1.15 – L'image A montre l'emplacement de la grille sur un porte-objet cryo (flèche blanche). L'image B représente le porte objet sur son support prêt pour le dépôt d'une grille, qui sera ensuite observée à l'aide d'un microscope TEM. Le microscope utilisé ici est le modèle JEM-2200FS (C). On peut voir à gauche la cuve contenant le générateur haute tension et à droite la colonne du microscope avec le porte-objet inséré

Les cristaux ainsi formés entraîneraient la détérioration de l'échantillon (Dubochet et al., 1988).

Sensibilité à la dose

Durant l'acquisition, une dose d'électrons trop importante entraîne des effets d'irradiation sur l'échantillon, il s'agit de dommages causés par le rayonnement avec des effets ionisant du faisceau et des dommages thermiques (Egerton et al., 2004). Il est donc nécessaire de contrôler la dose totale d'électrons appliquée à l'échantillon afin de limiter les dommages. Pour cela, l'acquisition est réalisée à une faible dose d'électrons (*low dose*). On considère que la dose reçue par un échantillon cryo-congelé ne doit pas dépasser $100e^-/\text{Å}^2$ pour une série tomographique. En limitant cette dose on protège l'échantillon lors de l'acquisition, cependant on diminue aussi fortement le contraste des images car on diminue le rapport signal sur bruit.

Nous aborderons dans le chapitre 5 une approche permettant de limiter la dose d'électrons reçue par l'échantillon ainsi que les développements informatiques associés. Le chapitre 4 traite quant à lui, de méthodes permettant d'augmenter le contraste des images. Une étude préliminaire de l'application d'une *phase plate* a été réalisée en parallèle du développement d'un plugin pour le contraste des images en TEM.

1.3 Le traitement des images en microscopie électronique en transmission

Les modes TEM et STEM présentés précédemment permettent d'acquérir des images de projection. Ces projections sont utilisées pour reconstruire le volume 3D d'un objet, que ce soit à partir d'une série d'inclinaisons (tomogramme), de paires d'inclinaisons ou d'une image unique (méthode des particules isolées, reconstruction icosaédrique et hélicoïdale). Afin d'appréhender les études réalisées lors de cette thèse, nous abordons dans cette section les concepts fondamentaux liés aux images numériques (§1.3.1) ainsi que les méthodes associées à la tomographie (§1.3.2).

1.3.1 Caractéristiques des images numériques en microscopie électronique

La partie précédente a introduit les différents outils permettant d'acquérir des informations structurales ou chimiques d'un échantillon. Ces informations sont acquises au moyen de capteurs présents dans des caméras CCD ou de détecteurs. Les capteurs sont des composants semi-conducteurs capables d'accumuler une charge électrique proportionnelle au nombre d'électrons qu'ils rencontrent. Ainsi, l'image formée est une matrice de valeurs correspondant à une grille d'éléments sensible à la surface du capteur. Chacun de ces éléments est associé à un pixel sur l'image. Le nombre d'éléments répartis sur une surface segmentée selon deux axes orthogonaux impose donc la taille de l'image. Les électrons transmis ayant atteint le détecteur ou le capteur sont ainsi dénombrés pour chaque pixel. L'image numérique est obtenue grâce à une amplification du signal électronique puis à une numérisation effectuée à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique. Cependant, la localisation précise des électrons incidents à la surface d'un même pixel n'est pas connue. Il en résulte donc un échantillonnage spatial. Autrement dit, la résolution de l'image obtenue et la finesse des détails perceptibles dépendent de la surface de chaque pixel du capteur. D'après le théorème de Nyquist-Shannon-Whittaker, il est possible de percevoir des détails dont la fréquence spatiale est deux fois supérieure à celle de l'échantillonnage.

Les processus d'amplification et de numérisation ne sont pas parfaits et peuvent introduire divers bruits. De plus, la conversion des valeurs dans le domaine numérique génère une discrétisation. Il en résulte que les valeurs des pixels sont comprises dans un certain intervalle de nombres entiers, généralement représentés sur 16 bits pour les caméras et les détecteurs usuels. Outre la possible saturation physique des éléments du capteur, le nombre limité de valeurs possibles pose la question de la dynamique du signal qu'il est possible d'acquérir.

Une fois la matrice de valeur obtenue, il est alors possible d'effectuer des traitements numériques des signaux perçus par le détecteur. Afin d'en extraire le maximum d'information, différents traitements peuvent être appliqués à l'image tels que : l'augmentation du contraste, la diminution du bruit de fond ou encore la limitation des effets de rampe. On essaie de s'affranchir des problèmes de dynamique en traitant des images dont les valeurs des pixels sont représentées par des nombres en virgule flottante (32 bit) plutôt que par des entiers. Ce faisant, il n'est pas nécessaire de normaliser les valeurs lors de chaque calcul afin de s'assurer qu'aucune information n'est perdue. Il est ensuite possible de caractériser ces images en utilisant des estimateurs tels que le contraste de Weber-Fechner, le coefficient d'aplatissement ou le coefficient d'asymétrie qui seront décrits et utilisés dans le chapitre 4. Il est également possible de segmenter les images en considérant certaines régions d'intérêt.

1.3.2 Images de projection

Nous avons vu précédemment l'utilité d'un microscope électronique en transmission pour la visualisation de la structure d'échantillons complexes. Il est important de noter que les images obtenues en TEM et STEM sont des images de projection de l'échantillon.

Une projection $p(r, \theta)$ est définie mathématiquement comme l'intégration de l'information

selon une direction, qui peut être par exemple une droite :

$$p(r, \theta) = \iint f(x, y) \delta(r - x \cos \theta - y \sin \theta) dx dy \quad (1.4)$$

avec r la coordonnée sur la droite d'intégration, θ l'angle de la projection, x et y les coordonnées du point dans l'image et δ la fonction de Dirac.

Dans le cas d'une image acquise en TEM, cela revient à calculer la somme des intensités des densités de matière le long d'un rayon. Ce qui donne :

$$p(r, \theta) = \sum I_d \quad (1.5)$$

avec I_d les électrons traversant l'échantillon le long d'un rayon r selon une projection θ .

1.4 La reconstruction 3D par tomographie électronique

La tomographie électronique est une méthode qui consiste à reconstruire le volume d'un objet en combinant ses différentes projections sur deux dimensions, acquises à différents angles. A cette fin, une fois l'échantillon déposé sur une grille et inséré dans un porte objet, on effectue une rotation selon un axe fixe : l'axe d'inclinaison (*tilt axis*) (figure 1.16). La série d'image représentant les projections de l'échantillon est alors obtenue en faisant varier l'orientation de l'objet selon différents angles comme illustré par la figure 1.16.

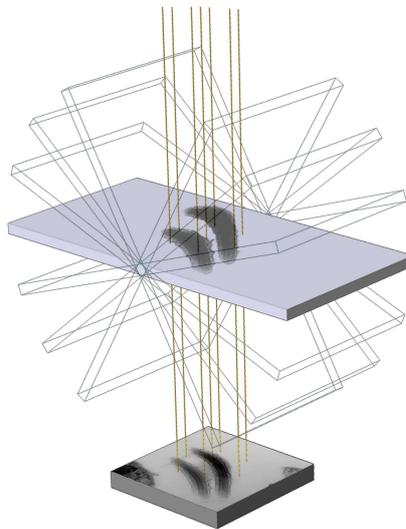


FIGURE 1.16 – Principe d'acquisition en tomographie électronique. Différentes images de projection de l'objet d'intérêt (en bleu) sont acquises en le faisant tourner autour de l'axe de rotation appartenant au plan de l'échantillon et perpendiculaire au faisceau d'électrons (venant d'en haut).

En combinant les images provenant des projections obtenues lors de l'acquisition, on peut retrouver les informations de structure ou générer des cartes chimiques 3D de l'objet. Ces combinaisons sont illustrées par la figure 1.17.

Ce processus de reconstruction est possible aujourd'hui grâce au travail du mathématicien autrichien Johann Radon, qui a découvert en 1917 une méthode permettant de reconstituer une image 2D à partir de ses projections (Radon, 1986; ?). Cette méthode a permis le passage d'une à deux dimensions. Par extension, il est possible d'obtenir une représentation 3D à partir de projections 2D. Ce processus est fondamental en tomographie.

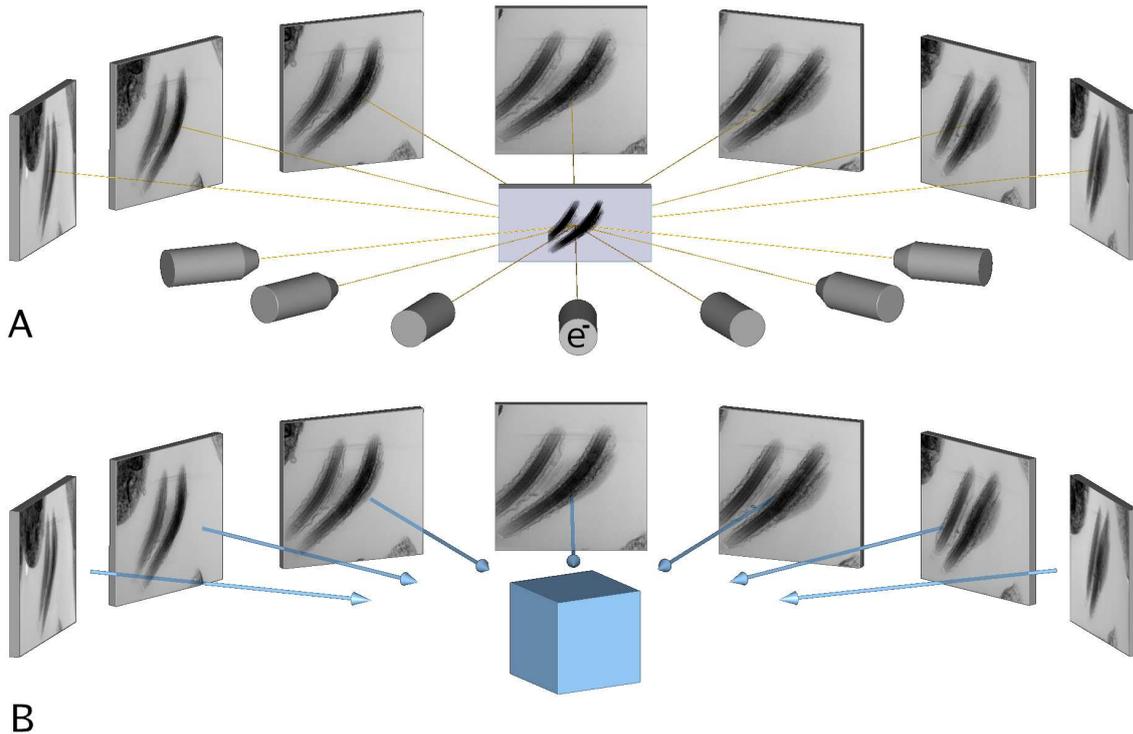


FIGURE 1.17 – Principe de reconstruction 3D à partir de projections 2D. (A) Les projections générées à différents angles de l'objet d'intérêt peuvent être combinées (B) pour reconstruire le volume de l'objet. Pour cela, il est nécessaire de connaître les angles utilisés pour chaque projection.

1.4.1 Reconstruction dans l'espace de Fourier

Il existe un lien entre le résultat de la transformée de Fourier des projections en dimensions n et le résultat de la transformée de Fourier en dimensions $n + 1$ de l'objet. En effet, une surface 2D perpendiculaire à l'axe d'inclinaison est une section de l'espace 3D que l'on cherche à reconstruire. Ce principe correspond au théorème de la section centrale qui établit que « *Dans l'espace réciproque, toute projection bidimensionnelle d'un objet correspond à une section centrale de la transformée de Fourier de l'objet 3D.* » (Shannon, 1949).

Ainsi, à partir de la transformée de Fourier des projections, correctement superposées dans le spectre, on peut obtenir le volume initial à l'origine des projections, en appliquant une transformation de Fourier inverse. Dans l'espace de Fourier, on assemble ainsi des spectres à n dimensions pour reconstruire le spectre en $n + 1$ dimensions. Le spectre obtenu dans l'espace de Fourier est composé :

- au centre, de la fréquence nulle qui correspond à la composante continue de l'image,
- suivie des basses fréquences qui sont associées à des variations de grandes périodes dans l'image,
- puis finalement, en s'éloignant encore du centre de l'image, se trouvent les fréquences plus hautes. Ces dernières correspondent dans l'espace réel à des contours fins ainsi qu'au bruit blanc.

Ainsi, connaissant l'ensemble des fréquences et des amplitudes, on peut déterminer une image de l'objet dans l'espace réel grâce à une transformée de Fourier inverse. Cependant, il n'est pas possible dans la pratique d'acquérir un nombre infini de projections. On ne peut donc pas obtenir un spectre défini en tous points. Il est dès lors nécessaire d'interpoler entre les spectres de dimensions inférieures avant de pouvoir effectuer une transformation de Fourier inverse. La précision de cette interpolation est fonction du nombre d'images acquises. En conséquence, la résolution est

moindre lorsque le nombre de projections acquises est réduit. C'est le cas en pratique en microscopie électronique en transmission. De plus en TEM, l'échantillon étant plan, les électrons ne peuvent pas le traverser lorsqu'il est placé dans la direction du faisceau. En effet, il présente dans ce cas une épaisseur apparente trop importante. Par exemple à 60° , l'épaisseur traversée est deux fois supérieure à celle de l'échantillon. Par conséquent, certaines projections sont manquantes (*missing wedge* ou cône manquant), ce qui nuit à la qualité de la reconstruction (figure 1.18).

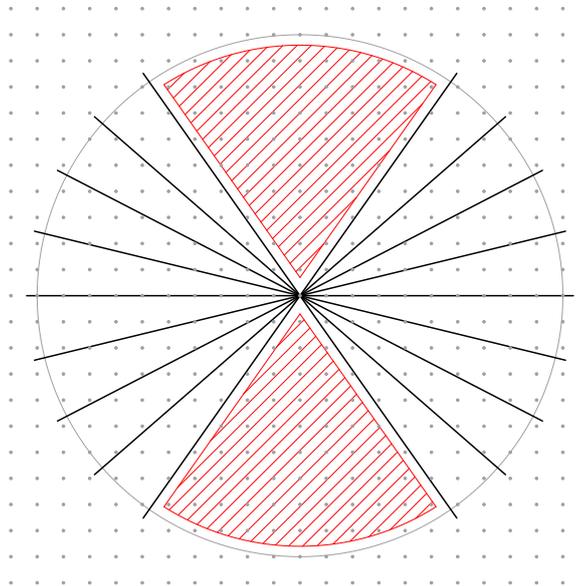


FIGURE 1.18 – Application dans l'espace de Fourier du théorème de la section centrale. En rouge est représenté le cône des angles non collectés (*missing wedge*) durant une acquisition tomographique, qui peut s'effectuer typiquement entre -65° et 65° .

En outre, l'interpolation nécessaire à la reconstruction du spectre de dimension supérieure génère une plus faible densité de valeurs sur la périphérie, tandis qu'au centre chaque accumulation contribue à augmenter la quantité d'information. Étant donné que l'échantillonnage au centre (caractéristiques de grande taille) est différent de celui en périphérie (détails fins), il faut procéder à un ajustement. Afin de compenser cette variation d'échantillonnage et ainsi obtenir une meilleure reconstruction ajustée à l'objet, il est en effet nécessaire d'effectuer une pondération des fréquences obtenues. Les différentes équations permettant de pondérer cette information sont regroupées sous le terme de rétroprojection pondérée (*weighted back projection*). Il est cependant à noter que dans le cas de données bruitées, la pondération augmentant artificiellement l'importance des hautes fréquences, l'amplification du bruit limite la résolution. La composante correspondant au bruit est en effet amplifiée.

1.4.2 Reconstruction itérative

Une alternative qui permet de s'affranchir des problèmes cités est l'utilisation d'algorithmes itératifs de reconstruction procédant coupe par coupe. Ces derniers ne nécessitent pas de transformée de Fourier. En effet, avec ce type d'algorithme, on considère qu'il y a autant d'angles θ que d'images 1D, ou de lignes de projection (figure 1.19). On considère également que la distance entre le rayon et l'axe de rotation est liée à la position k sur cette ligne. Le couple (k, θ) est donc associé à une densité de matière P rencontrée par le rayon incident qui le projette sur le détecteur. Ces valeurs indicatives de la densité $R_{k,\theta}$ sont connues grâce aux valeurs projetées. Elles sont les seules données disponibles pour effectuer la reconstruction permettant de trouver la densité en chaque point $P_{i,j}$ de la section à reconstruire; i et j étant les coordonnées des points sur cette section.

Les algorithmes itératifs sont conçus pour se rapprocher progressivement, à chaque itération, des densités de l'objet $P_{i,j}$ à reconstruire. En effet, à partir des projections et d'une estimation de la reconstruction de la section, le cœur de l'algorithme (boucle interne) tente de produire une

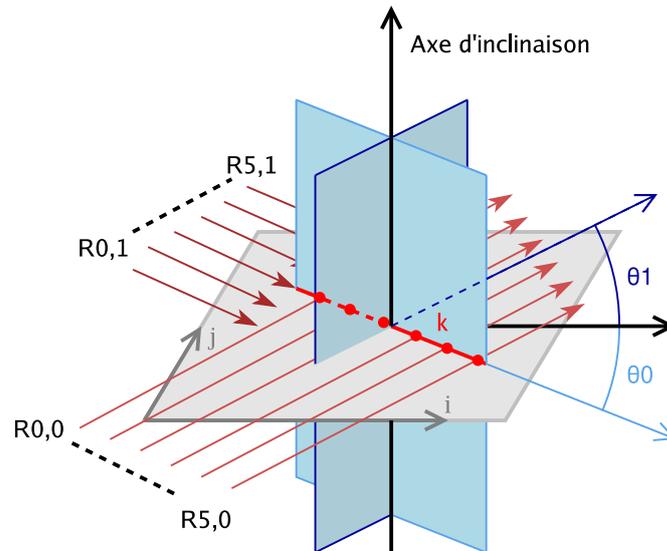


FIGURE 1.19 – Principe de la reconstruction itérative. Le plan gris correspond à une section du volume à reconstruire. Les plans bleus sont deux projections expérimentales obtenues selon un angle θ , autour de l'axe d'inclinaison. Dans cet exemple, les valeurs projetées $R_{k\theta}$ selon les directions des flèches rouges (R_{00} à R_{50}) sont combinées pour déterminer les densités $P_{i,j}$ de la section à reconstruire.

nouvelle reconstruction plus précise de la section de l'objet d'origine. Il est donc nécessaire d'en appliquer plusieurs itérations (boucle externe) jusqu'à obtenir un résultat satisfaisant.

L'algorithme de reconstruction ART (Gordon et al., 1970) réalise autant de sous-itérations qu'il y a d'images dans la série d'inclinaisons. Ainsi chaque itération applique le coeur de l'algorithme pour toutes les images de la série, tour à tour, et poursuit simplement le même procédé lors de l'itération suivante en reprenant à la première image. Le coeur de l'algorithme, pour une projection donnée issue d'une image de la série, détermine la projection théorique associée d'après la section reconstruite courante. Il utilise conjointement ces valeurs de densité (mesurées et calculées) projetées par les rayons (électroniques et virtuels) avec une formule de correction, afin de calculer les valeurs $P_{i,j}^{n+1}$ formant la section reconstruite suivante. Les auteurs de ART proposent deux formules de correction, l'une additive, l'autre multiplicative.

Les données obtenues à partir d'échantillons biologiques acquises en TEM étant souvent bruitées pour préserver l'échantillon (faible dose), la présence de ce bruit entraîne la formation d'artefacts lors de la reconstruction. Ceci compromet la capacité de ART à converger. Afin d'éviter ces écueils, on peut s'orienter vers une autre méthode itérative pour la reconstruction, telle que celle proposée par l'algorithme SIRT.

Dans le cas de SIRT (Gilbert, 1972), contrairement à ART, toutes les images de la série sont prises en compte simultanément par la formule de correction. Il n'est donc pas nécessaire d'appliquer des sous-itérations séparées pour chaque image. SIRT converge à chaque itération à la différence de ART qui peut diverger et dégrader la qualité de la reconstruction passé une certaine limite qui n'est pas prévisible.

D'autres algorithmes itératifs sont utilisés pour la reconstruction, tels SART (Andersen and Kak, 1984) ou encore OS-SART (Wang and Jiang, 2004). Ceux-ci sont basés sur les algorithmes ART et SIRT précédemment décrits. Il existe de plus, des variantes itératives filtrées incluant une étape supplémentaire de filtration dans l'algorithme de reconstruction. On peut citer parmi les plus répandues de ces méthodes : *Total Variation Minimisation* (TVM) (Chen et al., 2014), *Compressed sensing* (Guay et al., 2016; Kim et al., 2007; Leary et al., 2013) ou *Discret ART* (DART) (Batenburg and Sijbers, 2011; Chen et al., 2014).

1.4.3 Alignement des images

Comme précédemment expliqué, lors d'acquisitions en tomographie électronique, l'échantillon doit être incliné dans le microscope à l'aide d'un goniomètre autour de l'axe de rotation du porte-échantillon. Malgré un réglage optimal de l'eucentricité, il peut y avoir un jeu mécanique généralement inférieure à 0.5 μm . L'échantillon ne reste donc pas parfaitement au centre durant l'acquisition. Cet effet est d'autant plus important que le grandissement est élevé. Certains logiciels d'acquisition tomographique permettent de minimiser cette erreur en corrigeant le déplacement de l'objet pour chaque inclinaison. En outre, dans le cas de la cryo-tomographie électronique, il peut s'ajouter une instabilité thermique induisant des déplacements de l'objet à reconstruire. Ceci peut avoir des effets non négligeables sur la série de projections. Etant donné que tous les algorithmes de reconstruction tomographique font la supposition d'un axe commun et unique autour duquel l'échantillon tourne, il est essentiel de réaliser une étape d'alignement afin de déterminer avec précision l'orientation de cet axe. De plus, il est nécessaire de rendre cet axe commun à l'ensemble des images de la série. A cette fin, différentes familles d'algorithmes peuvent être utilisées. Trois d'entre elles sont décrites ci-dessous.

Corrélation croisée

La méthode d'alignement par corrélation croisée consiste à superposer deux images consécutives provenant d'une même série tomographique. On teste ainsi différentes possibilités de translations pour ne conserver que celles qui maximisent le coefficient de corrélation obtenu entre deux ensembles de pixels X et Y, correspondant aux deux images considérées. L'équation suivante permet de définir la valeur observée du coefficient de corrélation entre deux variables aléatoires X et Y :

$$\text{corr}(x, y) = \frac{\text{cov}(x, y)}{\sigma_x \sigma_y} \quad (1.6)$$

avec $\text{cov}(x, y)$ la covariance observée des variables X, Y dans les images, et σ_x, σ_y leurs écarts types associés.

On aligne ensuite la série entière en combinant les transformations obtenues pour chaque paire d'images. L'avantage de cette technique est sa vitesse d'exécution puisqu'elle peut-être optimisée en utilisant la transformée de Fourier (Kapinchev et al., 2015).

$$\text{PosMax}(\text{FT}^{-1}(\text{FT}(\text{img}_n) * (\text{FT})^*(\text{img}_{n+1}))) \quad (1.7)$$

Il s'agit de réaliser une transformée de Fourier (FT) sur l'image n , que l'on multiplie par la conjuguée de la transformée de Fourier de l'image $n + 1$, comme indiqué dans l'équation (1.7). En appliquant ensuite une transformée inverse, on peut obtenir la carte de corrélation recherchée. Un bon alignement peut être déterminé en utilisant les coordonnées du maximum de corrélation présent dans cette carte. L'ajustement d'une gaussienne sur le pic de corrélation permet d'extraire une position encore plus précise du maximum.

Néanmoins, cette approche en tomographie présente une limitation. En effet lors de l'acquisition, plus l'échantillon est incliné par rapport au faisceau, plus les bords de l'image se rapprochent du centre, en passant soit au-dessus, soit en-dessous du centre de l'image. Un effet d'aplatissement selon un axe apparaît, ce qui rend impossible une corrélation parfaite entre les images. Une amélioration des résultats peut être obtenu en divisant la largeur de l'image $i + 1$ par le cosinus de l'angle entre les images i et $i + 1$, dans la direction perpendiculaire à l'axe d'inclinaison. Cependant, il faut pour ce faire avoir une connaissance préalable de l'orientation de l'axe d'inclinaison. Par conséquent, cette méthode d'alignement est connue pour donner des résultats trop approximatifs. L'alignement ne cherchant pas de cohérence sur l'ensemble des images de la série. De plus, l'accumulation d'imperfections dans le calcul du coefficient de corrélation entre plusieurs images successives peut entraîner l'apparition d'une légère dérive. Enfin, cette méthode n'est pas capable de reconnaître des similitudes entre deux images ayant subi une déformation.

En réalité, cette approche ne fonctionne bien que dans le cas d'images ayant subi une translation car elle est assimilable à des comparaisons directes des images pixel par pixel. En effet, pour des images de $n \times n$ pixels, c'est l'équivalent d'une convolution dont la complexité algorithmique initiale de $O(n^4)$ est réduite par rapport à la méthode directe, en passant par l'espace de Fourier. Une telle approche de recherche directe de corrélation serait trop coûteuse en temps de calcul si d'autres types de transformations devaient être pris en compte. Ainsi, si en plus de la translation, des rotations selon différents angles devaient être corrigées, le temps de calcul augmenterait encore. Pour d'autres types de transformations l'optimisation basée sur la transformée de Fourier ne serait plus applicable.

Par conséquent, la corrélation croisée peut être utilisée dans la pratique uniquement pour pré-aligner les images. Pour cette raison, on s'intéresse à une autre classe de techniques d'alignement, qui consiste à trouver des correspondances non pas sur les valeurs des intensités des pixels, mais sur un nombre restreints de points caractéristiques extraits des images. Une recherche de correspondance sur les positions de ces points peut ensuite être effectuée, selon un principe de comparaison exhaustive similaire à la méthode de corrélation croisée. Dans ce contexte, le nombre de points caractéristiques à comparer est négligeable par rapport au nombre de pixels composants les images.

Marqueurs fiduciaires

La présence de marqueurs facilement reconnaissables sur l'image, et dont on peut mesurer précisément la position, aide à l'alignement d'une série d'images. Cette méthode nécessite généralement l'ajout de marqueurs externes dans la préparation de l'échantillon, avant l'acquisition de la série d'inclinaisons. Le choix de marqueurs fiduciaires varie selon le système d'imagerie utilisé et dépend de la taille de l'échantillon. En microscopie électronique en transmission, les marqueurs fréquemment utilisés sont les billes d'or. Grâce à son numéro atomique élevé, l'or ne laisse traverser que peu d'électrons ce qui en fait un marqueur particulièrement contrasté et donc facilement détectable. Un autre avantage de la bille d'or est sa sphéricité, elle apparaît sur les différentes images de la série d'inclinaisons sous la forme d'un disque de taille constante, et ce quelque soit l'angle. De plus, la maîtrise de la taille de ce marqueur (qui est disponible entre 5 et 25 nm) permet de sélectionner celle qui est visible sans pour autant masquer l'échantillon. Il existe différentes approches pour la détection et le suivi de marqueurs fiduciaires :

- La détection manuelle qui est une approche peu précise et longue à exécuter, car l'utilisateur doit sélectionner les marqueurs présents sur chaque image de la série.
- La détection semi-automatique qui nécessite que l'utilisateur effectue la sélection des marqueurs sur une seule image de la série, pour ensuite réaliser un suivi automatique des marqueurs. De ce fait, chaque alignement dépend de la sélection initiale, ce qui peut introduire un biais lié à une mauvaise répartition des marqueurs sélectionnés sur l'image.
- La détection automatique qui ne nécessite que l'ajustement des paramètres de détection. On considère toujours cependant un biais potentiel qui sera néanmoins, inférieur à celui des deux méthodes précédentes, car la sélection est réalisée sur un plus grand nombre de points.

Les coordonnées de billes obtenues sont ensuite utilisées pour créer un modèle 3D de points fiduciaires. Le modèle va ensuite être affiné en minimisant les distances entre les projections du modèle 3D et les coordonnées des billes. Cette minimisation est possible en appliquant aux images des translations, rotations et éventuellement en prenant en compte des déformations (Mastro-narde, 2007; Sorzano et al., 2009).

Détection de points invariants

Les points invariants correspondent à des points possédant des particularités, présents dans plusieurs images consécutives, qui sont appelés points d'intérêt, points clés ou encore points caractéristiques. La méthode de détection de ces points ne se base pas sur des marqueurs fiduciaires ajoutés lors la préparation de l'échantillon. Cette détection automatique s'appuie sur des propriétés mathématiques comme par exemple la détection de coins, de bords ou d'extrema locaux. Le suivi des points d'intérêt sur plusieurs images permettra d'établir les correspondances entre elles et d'en déduire les paramètres d'alignement (matrice de transformation).

En 2004, un nouvel algorithme de détection de points d'intérêt, SIFT (*Scale Invariant Feature Transform*) a été développé et proposé par David Lowe (Lowe, 2004). En 2014, Han *et al.* ont proposés d'utiliser SIFT pour l'alignement en tomographie électronique (Han et al., 2014) bien qu'il ne soit pas spécifique à cet usage. Depuis, d'autres algorithmes ont été développés en se basant sur le principe de SIFT. Ces algorithmes seront abordés par la suite dans le chapitre 4 où ils seront comparés en vue d'une application pour la tomographie électronique. Pour une meilleure compréhension de la suite, l'algorithme SIFT va être détaillé ici.

L'algorithme SIFT est une méthode de détection de points d'intérêt à laquelle on associe un descripteur unique, qui est utilisé pour apparier les points entre deux images et ainsi déterminer les paramètres d'alignement. Les étapes menant à l'alignement d'image en utilisant l'algorithme SIFT sont les suivantes :

- La première étape est la détection des points invariants, l'algorithme doit sélectionner des points dans une image qui pourront être facilement localisés dans une autre image. Ces points d'intérêt sont obtenus en utilisant les *extrema locaux* présents dans les images sans pour autant être liés à des structures spécifiques. Pour pouvoir identifier les points d'intérêt détectés, dans le cas de l'algorithme SIFT, un descripteur unique est créé pour chaque point à partir de son voisinage.
- L'étape suivante consiste en la recherche de correspondances dans les deux ensembles de points d'intérêt, un pour chaque image, à partir de leurs descripteurs. Alors que des positions de marqueurs fiduciaires sont comparés dans la méthode précédente pour réaliser l'appariement, la comparaison de descripteurs est utilisée ici. Une fois que les points d'intérêt sont apparés, ils peuvent être utilisés afin de déterminer les paramètres d'alignement entre les deux images.

La détection des points d'intérêt

Les algorithmes de détection sont essentiellement basées sur la présence de contours, c'est-à-dire la détection de la variation des niveaux d'intensité dans l'image. Dans le cas de l'algorithme de détection de SIFT, chaque point d'intérêt est identifié par : (x, y) ses coordonnées sur l'image, G l'orientation de son gradient en deux dimensions, s le facteur d'échelle ainsi que D le descripteur associé. La figure 1.20 donne un exemple de la composition d'un point d'intérêt détecté par SIFT.

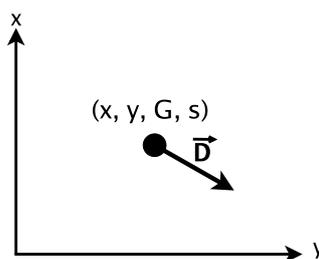


FIGURE 1.20 – Caractéristiques d'un point d'intérêt détecté avec SIFT : x et y sont ses coordonnées, G est l'orientation de son gradient dans l'espace, s le facteur d'échelle et D le descripteur associé

Afin de déterminer l'emplacement des points d'intérêt, on réduit la taille de l'image plusieurs fois pour l'obtenir à différentes échelles, qui sont appelés des octaves.

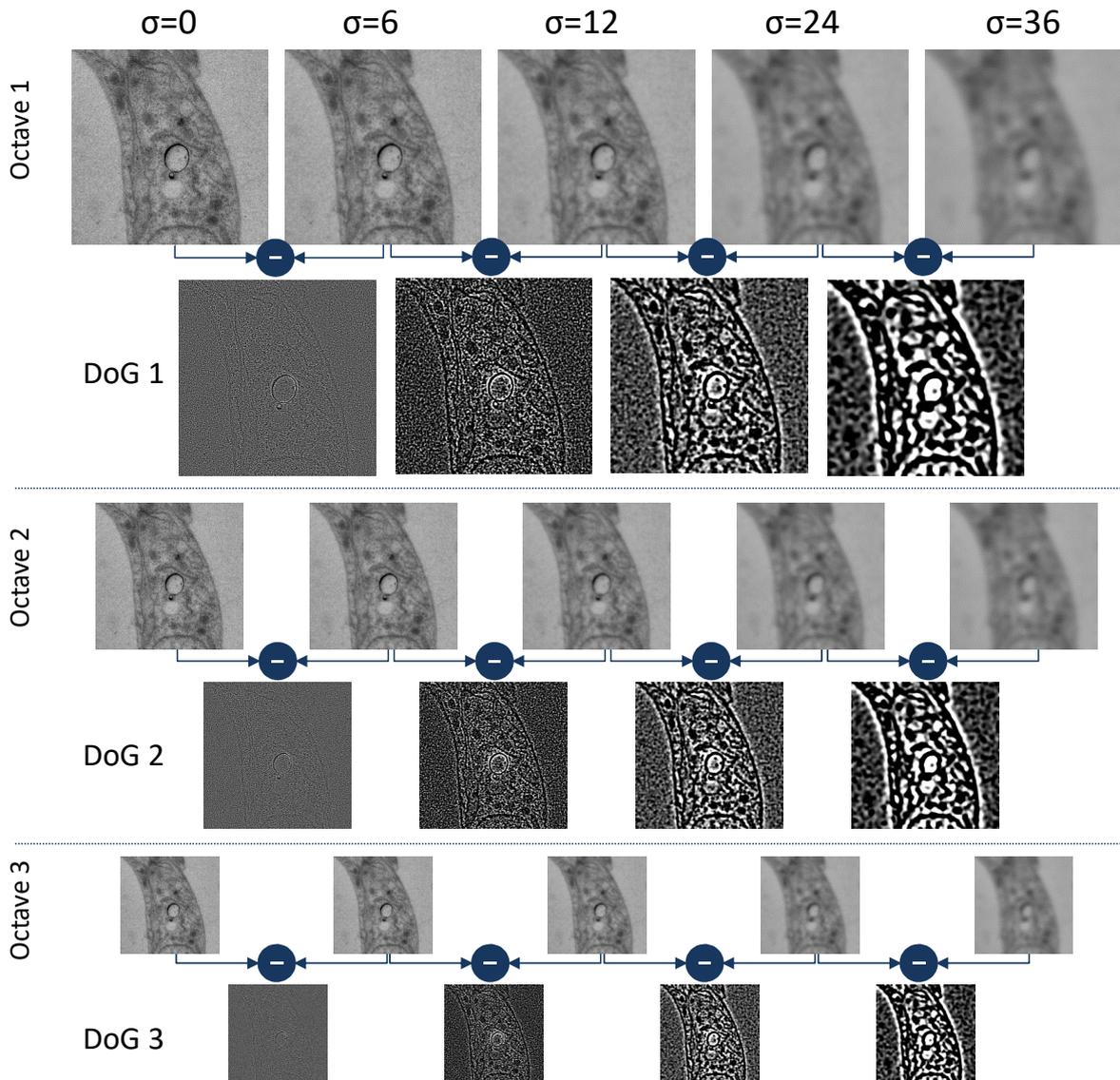


FIGURE 1.21 – Exemple d'une pyramide de différences de gaussiennes (DoG) obtenue à partir d'une pyramide de gradients. La pyramide de gradients a été réalisée sur un échantillon en résine de *Trypanosoma brucei*, elle se compose de 3 octaves (tailles d'images de 2048, 1024 et 512 pixels). Chaque octave est composée d'une image ($\sigma = 0$) sur laquelle a été appliqué différentes valeurs de flou gaussien ($\sigma = 0$, $\sigma = 6$, $\sigma = 12$, $\sigma = 24$ et $\sigma = 36$).

Sur chaque image on applique ensuite un flou gaussien de plus en plus prononcé. Les différents flous et octaves peuvent être représentés par une pyramide d'images comme illustré par la figure 1.21. On réalise ensuite un calcul de différences de gaussiennes (DoG) entre deux images consécutives pour une octave donnée. Pour cela, on soustrait les valeurs des pixels entre deux images, afin d'extraire les extrema locaux qui correspondront aux coordonnées des points d'intérêt.

Cette étape est ensuite effectuée pour chaque octave, ce qui permet d'identifier l'emplacement de l'ensemble des points d'intérêt présents dans l'image. Ils sont ensuite stockés avec les informations d'octave et de niveau de convolution qui ont conduit à leur détection. Toutefois, les points avec un faible contraste ou détectés sur un bord sont éliminés.

Construction du descripteur

En plus des coordonnées et de l'échelle, une orientation de gradient est calculée pour chaque point d'intérêt. Pour cela, le voisinage du point d'intérêt est découpé en sous-régions dans lesquelles des mesures de gradients sont effectuées. Ces gradients sont ensuite stockés dans un histogramme créé pour chaque sous-région. Cet histogramme regroupe les orientations de gradient au voisinage du point en un nombre limité de groupes (figure 1.22 A), qui sont pondérées par l'amplitude des gradients. L'orientation principale du point d'intérêt est définie par l'orientation la plus représentée dans l'histogramme (figure 1.22 A).

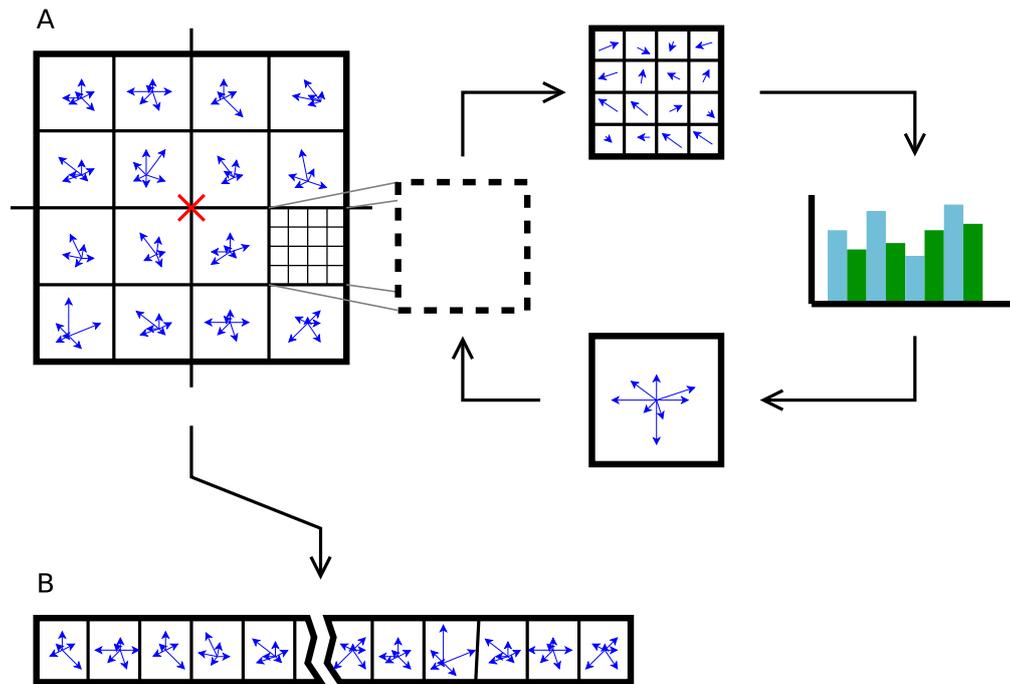


FIGURE 1.22 – Création du descripteur pour un point d'intérêt (croix rouge). La partie A montre les histogrammes d'orientations obtenus après le calcul de gradient pour chaque sous-région autour du point d'intérêt. Ces histogrammes sont constitués à partir des orientations des gradients. Le descripteur final est composé d'un vecteur contenant les différents histogrammes (B).

Un descripteur global du point d'intérêt est créé en concaténant tous les histogrammes du voisinage dans un unique vecteur (figure 1.22 B). Outre cette caractérisation de la zone de l'image autour du point d'intérêt par le descripteur, une pondération des valeurs des histogrammes permet de le rendre invariant devant les transformations locales affines. Ainsi, cette technique permet d'avoir un descripteur robuste et unique pour chaque point d'intérêt de l'image.

Appariement des points d'intérêt

Une fois que chaque point d'intérêt est caractérisé par son descripteur, il faut ensuite déterminer la meilleure correspondance parmi un ensemble de points d'une autre image. Pour cela, l'algorithme utilisé effectue une recherche exhaustive parmi tous les points. Pour estimer la qualité d'appariement de deux points, l'algorithme calcule la distance euclidienne entre les descripteurs. Afin de valider le meilleur appariement trouvé pour chaque point, Lowe (Lowe, 2004) propose la méthode *Best-bin first* (Beis and Lowe, 1997). Cette méthode considère les scores (distance) des deux meilleurs appariements possibles et, lorsque le rapport entre le meilleur et le deuxième est supérieur à un seuil fixé, le meilleur des deux est validé. Ces points vont ensuite être utilisés pour déterminer les paramètres d'alignement des images. Pour cela, SIFT utilise l'algorithme RANSAC (Fischler and Bolles, 1981). Ce dernier sélectionne de manière aléatoire des sous-ensembles de paire de points, jusqu'à trouver une transformation entre les deux images. Cette transformation

est ensuite appliquée à tous les points. On dénombre ensuite les paires de points qui se superposent, associant ainsi un score à cette transformation. Plusieurs tirages aléatoires sont réalisés et la transformation qui obtient le score le plus élevé est conservée.

Application de l'algorithme SIFT et adaptations

L'algorithme SIFT est utilisé dans différents domaines de l'imagerie allant de la photographie à la biologie en passant par la robotique. On peut citer notamment : la reconstruction de panorama en photographie (Brown and Lowe, 2003, 2007), son application pour l'aide à la localisation d'un robot dans son environnement (Se et al., 2001), la reconnaissance et le suivi d'objet 3D (Gordon and Lowe, 2006), ou encore la détection de mouvement humain dans des vidéos (Laptev and Lindeberg, 2004). En biologie, SIFT a été appliqué pour l'imagerie IRM (Scovanner et al., 2007). Il a aussi été utilisé pour la reconstruction en tomographie électronique (Han et al., 2014) mais également pour la reconstruction de surfaces acquises en microscopie électronique à balayage (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) (Tafti et al., 2018).

Depuis 2004, des variantes de SIFT, ainsi que d'autres algorithmes basés sur SIFT ont vu le jour, en voici une liste non exhaustive :

- PCA-SIFT (Ke and Sukthankar, 2004), GSIFT (Lodha and Xiao, 2006), (Abdel-Hakim and Farag, 2006) et ASIFT (Morel and Yu, 2009) qui sont des variantes de SIFT.
- Il existe aussi des adaptations de SIFT qui n'utilisent pas la même méthode de détection, telles que FAST (détection de coins) (Rosten and Drummond, 2006) et MSER (segmentation) (Matas et al., 2004).
- Certains utilisent une autre définition du descripteur, tels que SURF (Bay et al., 2008), KAZE (Alcantarilla et al., 2012) et FREAK (Alahi et al., 2012). Ce descripteur peut être binaire, c'est-à-dire composé d'un vecteur de booléens remplaçant les histogrammes de voisinage comme dans : BRISK, ORB (Rublee et al., 2011) et AKAZE (Alcantarilla et al., 2013).

Ils présentent tous différentes spécificités. Certains d'entre eux ont d'ailleurs fait l'objet d'études comparatives pour leur utilisation en photographie (Işık, 2015; Tareen and Saleem, 2018; Wu et al., 2013) ou encore en microscopie électronique à balayage (Tafti et al., 2018).

Le chapitre 5 de cette thèse présente une étude comparative d'une sélection d'algorithmes, ayant pour but leur application à la tomographie en microscopie électronique en transmission.

1.5 Objectifs de la thèse

Comme on a pu le voir, la cryo-microscopie, notamment en mode STEM, offre de nouvelles possibilités d'observation et d'amélioration des images pour réaliser des études structurales. **Les applications en biologie sont en train de motiver le développement de nouvelles approches, que ce soit dans les méthodes d'acquisition ou dans le traitement des images. Cette thèse a pour but d'y contribuer grâce à :**

1. l'exploration de stratégies d'acquisition innovantes en combinant des méthodes déjà existantes,
2. l'évaluation d'algorithmes permettant l'alignement d'images lorsque l'ajout de marqueurs externes n'est pas possible,
3. l'implémentation de méthodes augmentant le contraste des images,
4. l'optimisation de la reconstruction des séries acquises avec la méthode d'acquisition parcimonieuse Random-Beam STEM.

Pour cela, lors de cette thèse, j'ai abordé chacun de ces thèmes à travers :

1. la conception et évaluation d'une approche combinant la filtration à perte d'énergie avec l'acquisition STEM (chapitre 2);
2. le développement et l'évaluation d'une méthode d'alignement basée sur la détection automatique de points caractéristiques dans des images (chapitre 3);
3. l'évaluation d'une technologie instrumentale récente et la mise en place d'une méthode de traitement d'image permettant une mise en valeur des détails dans les images grâce au contraste de phase (chapitre 4);
4. la conception et l'implémentation d'un algorithme multi-échelle pour l'alignement et la reconstruction de séries tomographiques STEM basées sur des données parcimonieuses (chapitre 5)

Chapitre 2

Approche STEM filtrée (Energy filtered-STEM)

2.1 Problématique

Qu'ils soient inclus en résine ou sous forme hydratée-congelée, les échantillons biologiques ont une tolérance variable à la dose d'électrons reçue. Les échantillons cryo sont en effet plus sensibles aux dommages engendrés par le faisceau d'électrons (Buban et al., 2009). Afin de limiter ces dommages, les acquisitions sont généralement réalisées à faible dose (*low dose*), typiquement inférieure à $10 e^-/\text{Å}^2$ par image. Une dose d'électrons faible préserve mieux l'échantillon dans le temps mais entraîne une dégradation de la qualité de l'image, ce qui engendre un contraste et un rapport signal sur bruit (SNR) plus faible.

L'imagerie TEM en énergie filtrée (EF-TEM) est basée sur la sélection en énergie des électrons. Son utilisation en mode *zero-loss* (EF-TEM) permet d'obtenir des images avec un meilleur rapport signal sur bruit, en filtrant les électrons inélastiques.

D'autre part, le STEM est une méthode d'acquisition de plus en plus utilisée dans les études par microscopie électronique en biologie structurale. En effet il facilite, entre autres, l'étude d'échantillons épais qui dépassent les 500 nm. Cette technique permet ainsi d'augmenter le contraste tout en diminuant la dose d'électrons reçue par les échantillons (Wolf et al., 2014).

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la combinaison de la méthode d'acquisition STEM à l'imagerie électronique en énergie filtrée (EF-STEM). Ceci devrait permettre d'augmenter le contraste tout en améliorant le rapport signal sur bruit de l'image. Cette combinaison est évaluée sur des échantillons sensibles aux dommages induits par la dose d'électrons.

2.2 Approche expérimentale

Le chapitre 1 présente les deux types de filtres à perte d'énergie existant : les filtres *in column* et les filtres *post column*. Le laboratoire possède un microscope JEM-2200FS qui est équipé d'un filtre *in column* fonctionnant en TEM et en STEM. Il est ainsi possible d'étudier la combinaison des deux méthodes d'acquisition EF et STEM, ce que je réalise ici.

La première étape de l'évaluation de cette combinaison EF-STEM, a été la caractérisation des paramètres d'acquisition sur des images uniques. Pour cela, des images avec et sans filtre ont été acquises en faisant varier différents paramètres. Nous avons réalisé ces tests sur un échantillon épais (300-500 nm) de Paramécie inclus en résine. Il s'agit plus particulièrement de l'axonème (Ishikawa, 2017), qui est la partie axiale d'un flagelle. Il est composé de microtubules permettant le mouvement. Cet échantillon a été utilisé afin d'étudier les facteurs qui peuvent avoir une influence sur les conditions d'acquisition. Il s'agit de l'angle de convergence, de l'angle de collecte, de la taille du diaphragme, de la taille de la sonde, de la longueur de caméra et enfin de la vitesse de balayage.

Lors d'une seconde étape, des tests ont été réalisés afin de définir les conditions d'acquisition d'un échantillon hydraté-congelé plus sensible à la dose d'électrons que l'échantillon précédent.

Ce second échantillon contient des débris cellulaires.

Afin de mettre en évidence le gain de SNR entre les images acquises avec et sans filtre, il a été choisi d'effectuer le calcul suivant :

$$SNR_n = SNR_{image_filtrée} - SNR_{image_non-filtrée} \quad (2.1)$$

avec le rapport signal sur bruit d'une image exprimé comme suit :

$$SNR = 10 * \log_{10} \left(\frac{\bar{\mu}}{\sigma} \right)^2 \quad (2.2)$$

où $\bar{\mu}$ est la moyenne des intensités du signal et σ l'écart type des valeurs du fond.

2.3 Résultats

2.3.1 Caractérisation des conditions d'acquisition du microscope JEM-2200FS

Angle de convergence

La relation entre l'épaisseur de l'échantillon et la valeur de l'angle de convergence est un facteur critique dans l'acquisition des images en STEM, comme montré dans la littérature (Wolf et al., 2014). En effet, il existe une relation inverse entre la profondeur de champ et la valeur de l'angle de convergence. Pour des acquisitions d'images à partir d'échantillons ayant une épaisseur inférieure au micron, l'angle de convergence fréquemment utilisé est de 10 mrad (Sousa et al., 2009). Cependant, dans le cas d'échantillons plus épais, il est préconisé d'utiliser des angles plus petits, descendant jusqu'à 2 mrad (Sousa et al., 2009). Ceci permet d'avoir une profondeur de champ plus importante et ainsi d'obtenir une information cohérente sur tout l'échantillon.

Pour débiter la caractérisation des conditions d'acquisition d'échantillons en EF-STEM, il est nécessaire de déterminer l'angle de convergence du microscope (figure 2.1) qui dépend des diaphragmes utilisés.

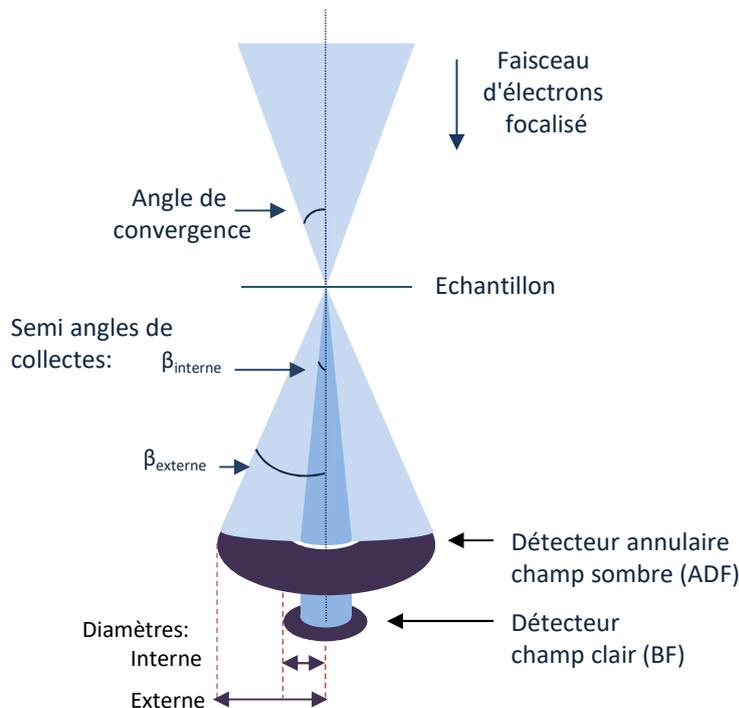


FIGURE 2.1 – Mise en évidence de l'angle de convergence et des demi-angles de collectes ($\beta_{interne}$ et $\beta_{externe}$) en mode STEM.

Afin de mesurer ces angles, on observe un réseau cristallin bien défini en TEM. Le réseau est illuminé par le faisceau d'électrons incident qui génère des figures de diffraction caractéristiques. Ces figures résultent de la différence de parcours des électrons interagissant sur différents plans cristallin (figure 2.2).

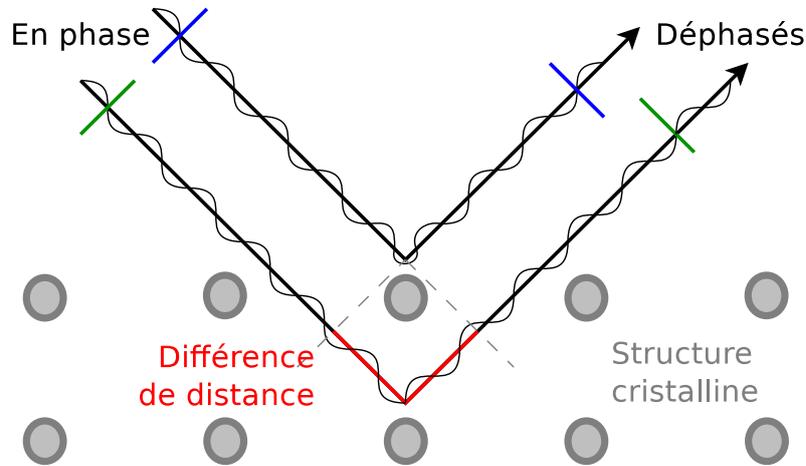


FIGURE 2.2 – Introduction d'une différence de phase entre deux électrons (flèches noires) par le réseau cristallin d'un échantillon. Ceci est mis en évidence par une distance non nulle entre les lignes bleues et vertes après le passage des électrons dans le cristal.

La forme, ainsi que les dimensions des taches de diffraction, sont dépendantes du réseau cristallin, de son orientation par rapport au faisceau incident, de l'énergie des électrons et du diamètre du diaphragme utilisé. C'est pourquoi nous réalisons différentes mesures en variant le diamètre des différents diaphragmes.

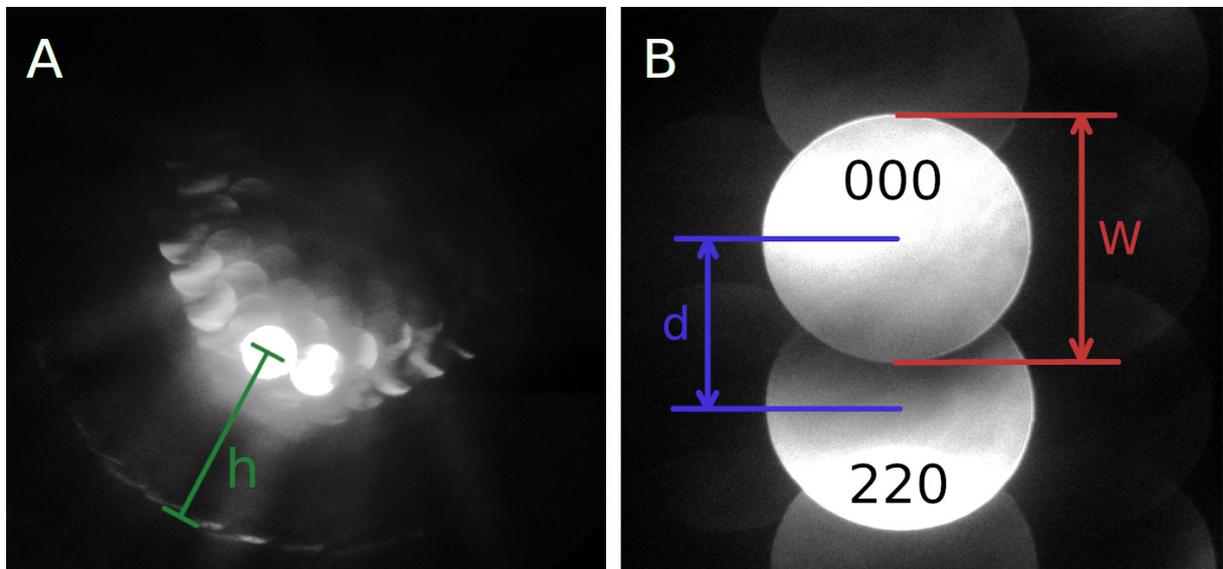


FIGURE 2.3 – Figures de diffraction caractéristiques d'un faisceau convergent sur une structure cristalline de Silicium (Si, motif 111). A) Disques formés par les faisceaux transmis et diffractés, entourés par un anneau de Holz visible en bas à gauche. La distance entre l'anneau de Holz et le centre du disque Si (000) est h . B) Image permettant de mesurer le diamètre des disques (W) et la distance (d) entre leur centre (Si 000 et Si 220).

Lorsque l'on souhaite mesurer l'angle de convergence d'une configuration STEM, il est possible d'effectuer des mesures sur les figures de diffraction données par un échantillon connu. Le silicium et l'or sont souvent utilisés à cette fin. L'angle de convergence peut ainsi être déduit à partir du diamètre des taches et de leur écartement (figure 2.3). Pour cela, nous avons besoin de

connaître l'angle de diffraction θ_D induit par le cristal (équation (2.3)). Il permettra ensuite de déterminer l'angle de convergence θ_{Cv} à partir de l'équation (2.4) fourni par le constructeur (JEOL, 2003).

$$\theta_D = \frac{\lambda}{S} \quad (2.3)$$

où λ est la longueur d'onde de l'électron à 200 kV et S correspond à l'espacement des atomes de Silicium dans le réseau cristallin.

$$\theta_{Cv} = \theta_D \times \frac{W}{d} \quad (2.4)$$

où θ_{Cv} est l'angle de convergence, θ_D l'angle de diffraction, W le diamètre du disque de diffraction et d est la distance entre les centres Si(000) et Si(220) (figure 2.3).

Diaphragme	CLA		OLA				ENTA	
	#3	#4	#1	#2	#3	#4	#3	#4
diamètre en μm	40	10	50	30	15	5	40	20
Demi-angle de convergence en mrad	9.2	2.25	14	7	22	12.3	11.4	1.1

FIGURE 2.4 – Estimation des angles de convergence pour le microscope JEM-2200FS selon la formule du constructeur (équation (2.4)). Le tableau contient les demi-angles de convergence en fonction des différents diaphragmes appliqués : le diaphragme condenseur (CLA, *Condenseur Lens Aperture*), le diaphragme objectif (OLA, *Objectif Lens Aperture*) et le diaphragme d'entrée (ENTA, *Entrance Aperture*).

D'après les résultats obtenus (tableau 2.4), les diaphragmes condenseurs de 40 μm et 10 μm correspondent aux demi-angles de convergence de 10 et 2 mrad respectivement (Sousa et al., 2009). L'échantillon utilisé ayant une taille inférieure à 1 μm , l'angle de convergence approprié est de 10 mrad. La suite de la caractérisation des conditions d'acquisition s'effectuera donc avec un diaphragme condenseur de 40 μm .

Angle de collecte

Outre l'angle de convergence, un autre facteur important pour l'acquisition d'images STEM est l'angle de collecte. Il est calculé à partir des valeurs des angles $\beta_{externe}$ et $\beta_{interne}$ (figure 2.1) et est dépendant de la longueur de caméra. La longueur de caméra correspond à la distance entre le détecteur STEM et l'échantillon. D'après une évaluation du contraste et du SNR en STEM BF par une simulation de Monte Carlo, il apparaît que plus l'angle $\beta_{externe}$ est grand, plus le SNR et le contraste diminuent (Sousa et al., 2009). De plus, ces simulations montrent qu'avec des échantillons ayant une épaisseur moyenne de 500 nm, la valeur du demi-angle $\beta_{externe}$ devrait se situer autour de 13 mrad (Sousa et al., 2009). Nous avons donc déterminé les différentes valeurs des angles en fonction des longueurs de caméra disponibles dans notre microscope JEM-2200FS. Pour cela, il est possible d'utiliser les figures de diffractions de l'or ou du silicium. L'angle de collecte peut être déterminé grâce au diamètre de l'anneau de Holz (Martin, 2014) (figure 2.3). Il est tout d'abord nécessaire de connaître l'angle à la ligne de Holz (équation (2.5)) afin de déterminer l'angle de collecte à partir de la formule constructeur selon l'équation (2.6) (JEOL, 2003).

$$\theta_H = \theta_D \times \frac{d}{h} \quad (2.5)$$

avec d la distance entre les centres Si(000) et Si(220) et h le rayon de l'anneau de Holz (figure 2.3).

$$\theta_{Cl} = \theta_H \times \frac{Id}{2 * h} \quad (2.6)$$

où θ_{Cl} est l'angle de collecte, θ_H est l'angle de diffraction à la ligne de Holz, Id le diamètre interne du détecteur HAADF et h le rayon de l'anneau de Holz.

Longueur de caméra en cm	ADF, angle de collecte interne en mrad	ADF, angle de collecte externe en mrad	BF, angle de collection en mrad
4	86	232	137
5	78	206	121
6	64	172	101
8	42	112	66
10	36	98	58
12	30	80	47
15	24	66	39
20	20	54	32
25	16	46	27
30	14	40	24
40	12	32	19
50	10	28	17
60	8	22	13
80	6.5	16	9
100	6	14	8
120	4.5	12	7
150	4	10	6

FIGURE 2.5 – Estimation des angles de collecte pour le microscope *JEM-2200FS*.

Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 2.5. On y retrouve les différentes longueurs de caméra associées aux demi-angles de collectes. La longueur de caméra théorique correspond en STEM HAADF aux demi-angles $\beta_{externe}$ compris entre 12 et 16 mrad et en STEM BF aux angles compris entre 9 et 7 mrad, soit les longueurs de caméra de 120 et 80 cm respectivement.

Taille de sonde

Après avoir déterminé les angles de convergence et de collecte de manière expérimentale, nous pouvons retenir les valeurs optimales pour le diamètre du diaphragme condenseur et la longueur de caméra. Par la suite, nous avons testé différentes tailles de sondes en EF-STEM. Pour cela, des acquisitions ont été réalisées à partir de coupes de 300 nm d'axonème de paramécie (figure 2.6) (Pearson and Winey, 2009; Tassin et al., 2015). Celles-ci ont été obtenues en procédant à plusieurs paires d'acquisitions d'images à chaque fois filtrées et non filtrées. Certaines paires d'acquisitions ont débuté avec le filtre et d'autre sans, en alternance, afin de prendre en compte la dégradation de l'échantillon dans le temps.

A partir de ces images, les valeurs de SNR_n ont été calculées. On observe que pour des longueurs de caméra supérieures à 80 cm, le SNR_n de paires d'images varie très faiblement en fonction de la taille de la sonde, alors que dans le cas contraire, le SNR_n augmente significativement quand la valeur de la taille de la sonde augmente (figure 2.7). D'après ces expériences, les conditions optimales d'acquisition correspondent à une longueur de caméra de 80 cm, avec une taille de sonde de 1.5 nm, ce qui est le maximum pour notre microscope.

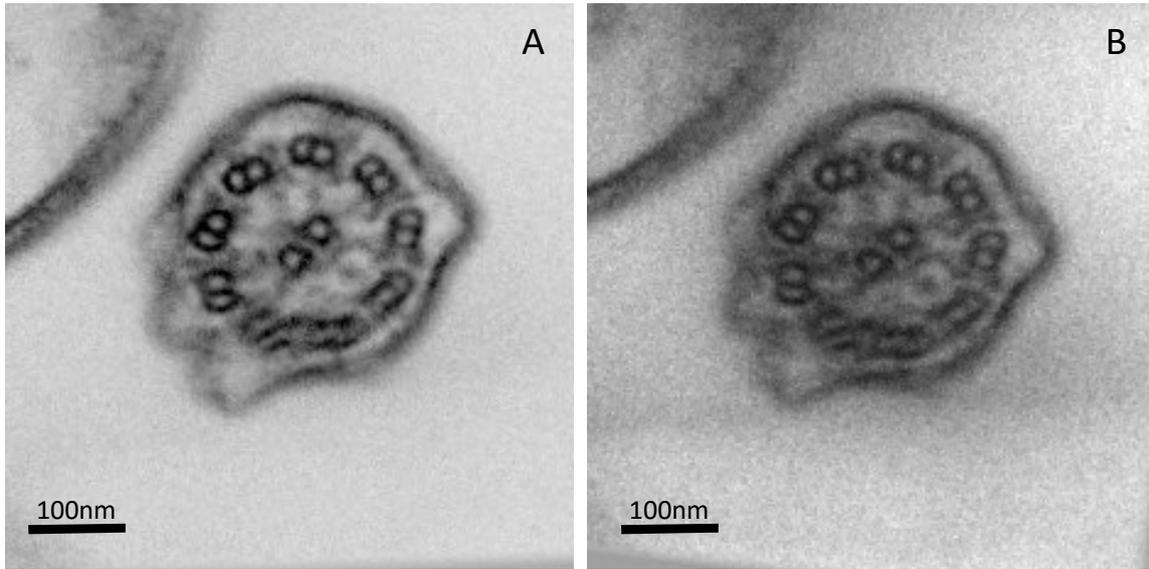


FIGURE 2.6 – Echantillon test d'axonème de *Paramecium* acquis en mode STEM-BF : (A) sans filtre Oméga et (B) avec filtre Oméga.

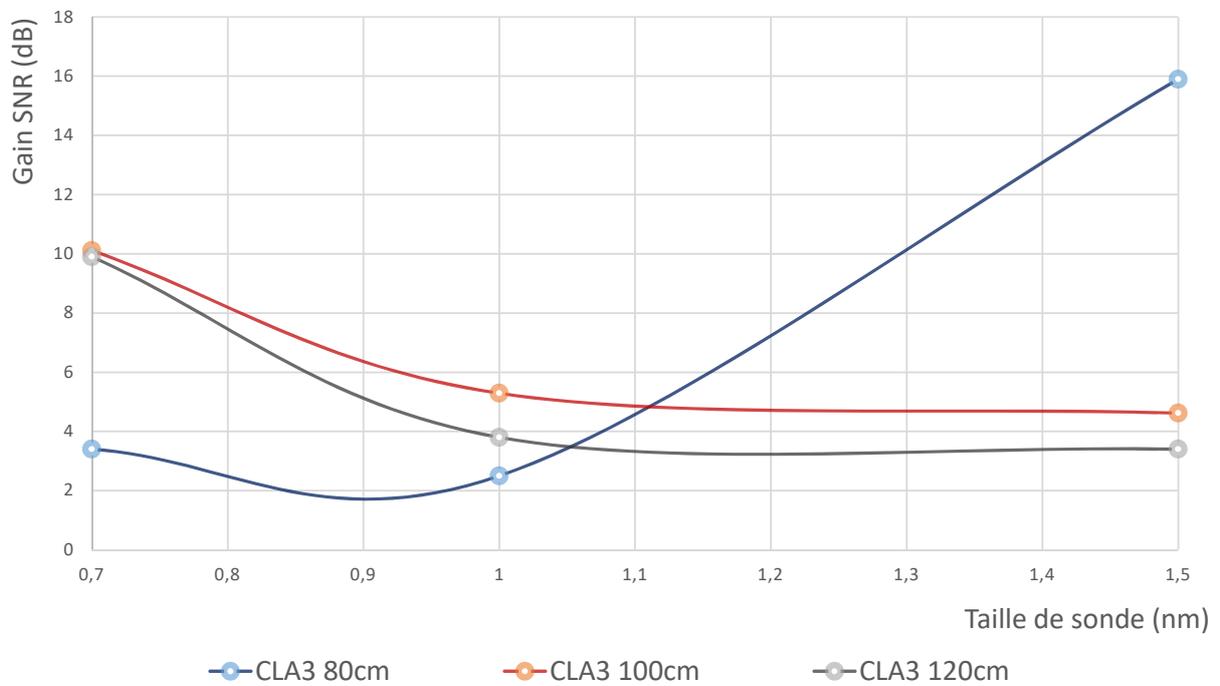


FIGURE 2.7 – Etude des paramètres optimaux pour des acquisitions STEM BF : évaluation du SNR pour trois longueurs de caméra 80, 100 et 120 cm avec un CLA #3 et une taille de sonde comprise entre 0.7 et 1.5 nm.

Vitesse de balayage

Enfin, le dernier paramètre pris en compte est la vitesse de balayage mesurée dans les conditions d'acquisition déterminées précédemment. Cette vitesse est représentée en fonction du SNR dans la figure 2.8. L'analyse de la courbe, nous montre qu'elle présente une valeur asymptotique de SNR_n approchant un maximum de 16 dB, qui est observable pour des vitesses de balayage de 28 $\mu\text{s}/\text{pixels}$. La valeur du SNR_n se dégrade rapidement pour des vitesses de balayages inférieures à 12 $\mu\text{s}/\text{pixels}$. Par conséquent, l'intervalle de la vitesse de balayage optimale varie entre 12 et 28 $\mu\text{s}/\text{pixels}$.

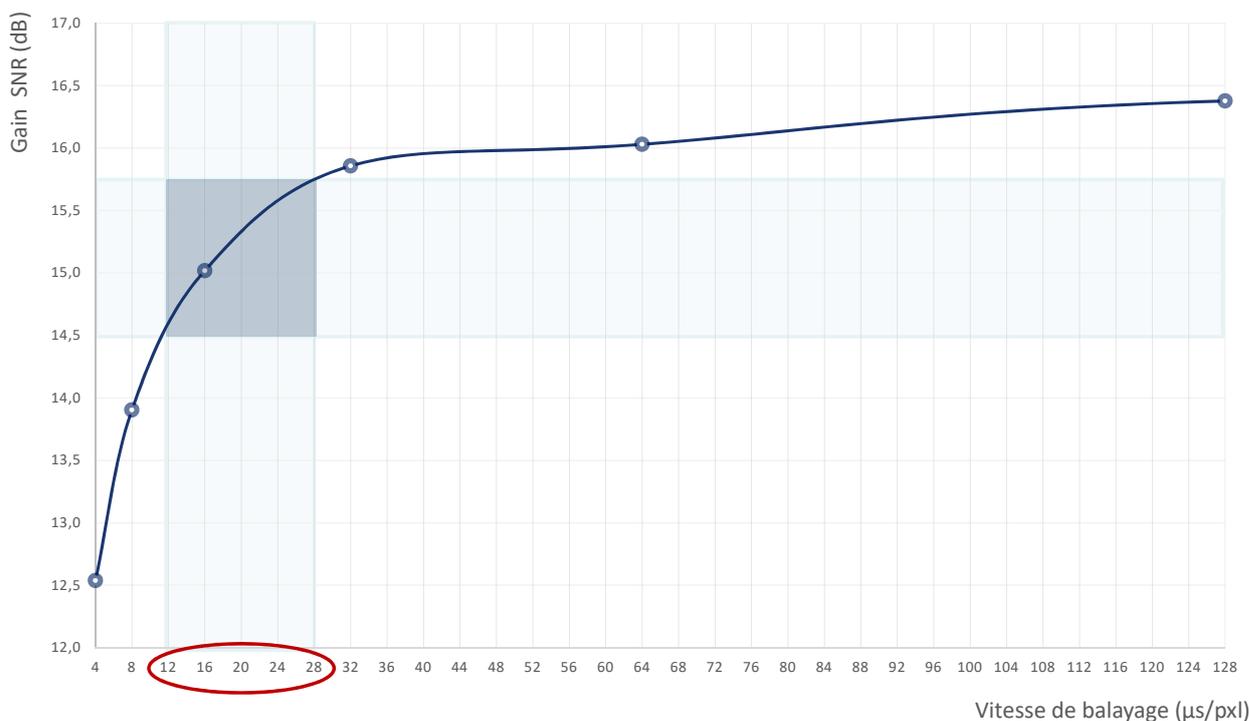


FIGURE 2.8 – Estimation de la vitesse de balayage optimale lors d'acquisition en STEM BF. Pour différentes vitesses de balayage allant de 4 à 128 $\mu\text{s}/\text{pixel}$, un calcul de SNR_n a été effectué afin de visualiser la variation du gain en fonction de la vitesse de balayage.

En conclusion, les conditions d'acquisition déterminées avec notre JEM-2200FS pour le mode EF-STEM sur un échantillon inclus en résine époxy de 300nm d'épaisseur, sont :

- l'utilisation d'un diaphragme condenseur CLA#3 (40 μm),
- une longueur de caméra de 80 cm,
- une taille de la sonde de 1.5 nm,
- une vitesse de balayage comprise entre 12 et 28 $\mu\text{s}/\text{pixels}$.

2.3.2 Applications

Echantillon hydraté-congelé

Une fois les paramètres d'acquisition établis, nous les avons utilisés pour l'acquisition d'images à partir d'échantillons hydratés-congelés. Il est à signaler que pour limiter la dose reçue par l'échantillon, la vitesse de balayage a été fixée à la valeur minimale déterminée précédemment, c'est-à-dire 12 $\mu\text{s}/\text{pixels}$. De plus, il a été défini que les images seraient acquises dans un certain ordre : une image non filtrée, suivi de l'insertion de la fente permettant une acquisition filtrée en énergie. Ceci assure que la dégradation de l'échantillon dans le temps due à la dose reçue ne joue pas en faveur du filtrage. Une fois les images obtenues, on a été en mesure de déterminer leur SNR respectif afin de calculer le SNR_n . Ce calcul a été réalisé sur les images après correction dans le logiciel

ImageJ d'un effet de rampe, dû à la variation de l'épaisseur de la glace dans l'échantillon, par un *rolling ball filter* de fenêtre 50 (Sternberg, 1983). Le résultat montre une augmentation du SNR_n de 3 dB. Ceci permet de mettre en évidence des objets dans l'image filtrée difficilement visibles dans l'image non filtrée (figure 2.9).

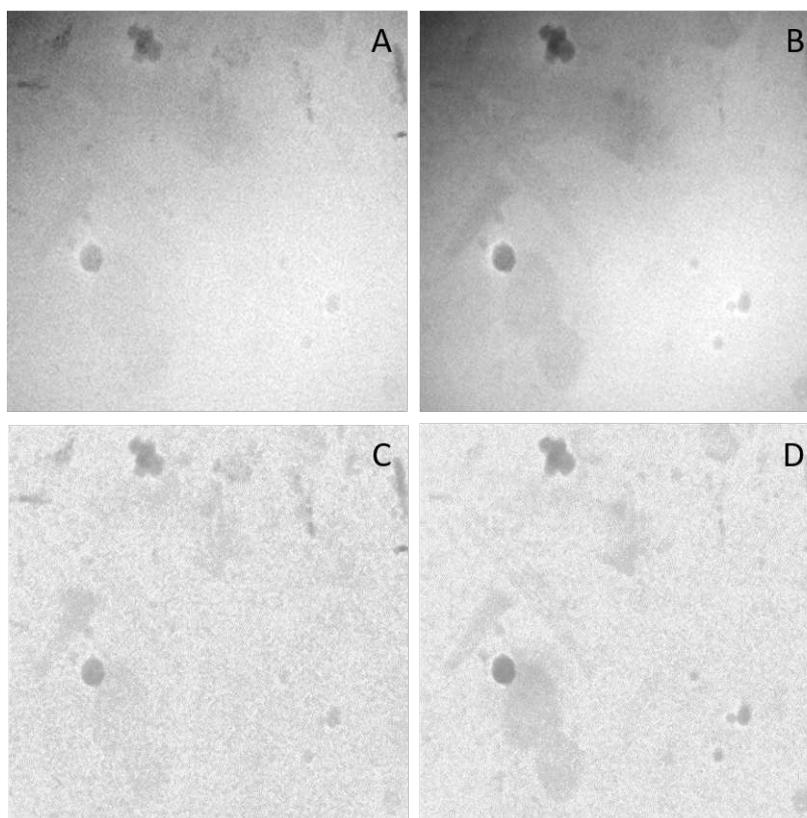


FIGURE 2.9 – Acquisition STEM non filtrée (A) et filtrée (B) de débris cellulaire. Les images C et D correspondent respectivement aux images A et B après application d'un filtre *rolling ball* qui permet de corriger l'effet de rampe visible initialement.

Série tomographique

Ces résultats encourageants nous ont convaincu d'élargir les tests de l'approche EF-STEM à des applications en tomographie sur des échantillons de 500 nm d'épaisseur inclus en résine. Les résultats préliminaires obtenus ont mis en évidence les difficultés associées au déplacement de la fente du filtre à chaque angle d'inclinaison. Ce déplacement peut s'expliquer par la charge de l'échantillon, on peut alors soit recentrer la fente, soit recentrer la lentille du filtre (*Filter Lens*). De ce fait, il n'a été possible d'obtenir qu'une seule série complète d'images filtrées et non filtrées entre 61° et -70° . Ceci dans les mêmes conditions d'acquisition établies lors de l'étude précédente de caractérisation des conditions d'acquisition du microscope JEM-2200FS. Les reconstructions présentées dans la figure 2.10, sous forme de série d'images, sont très similaires. Cependant, l'analyse des histogrammes (figure 2.11) obtenus pour chaque reconstruction montre une augmentation de la quantité d'informations pour la région correspondant aux valeurs de pixel comprise entre 30 et 100. On y observe une augmentation de la dynamique. En raison des contraintes expérimentales fortes et du faible gain obtenu, nous avons conclu qu'en l'état, l'approche avait peu d'intérêt en tomographie.

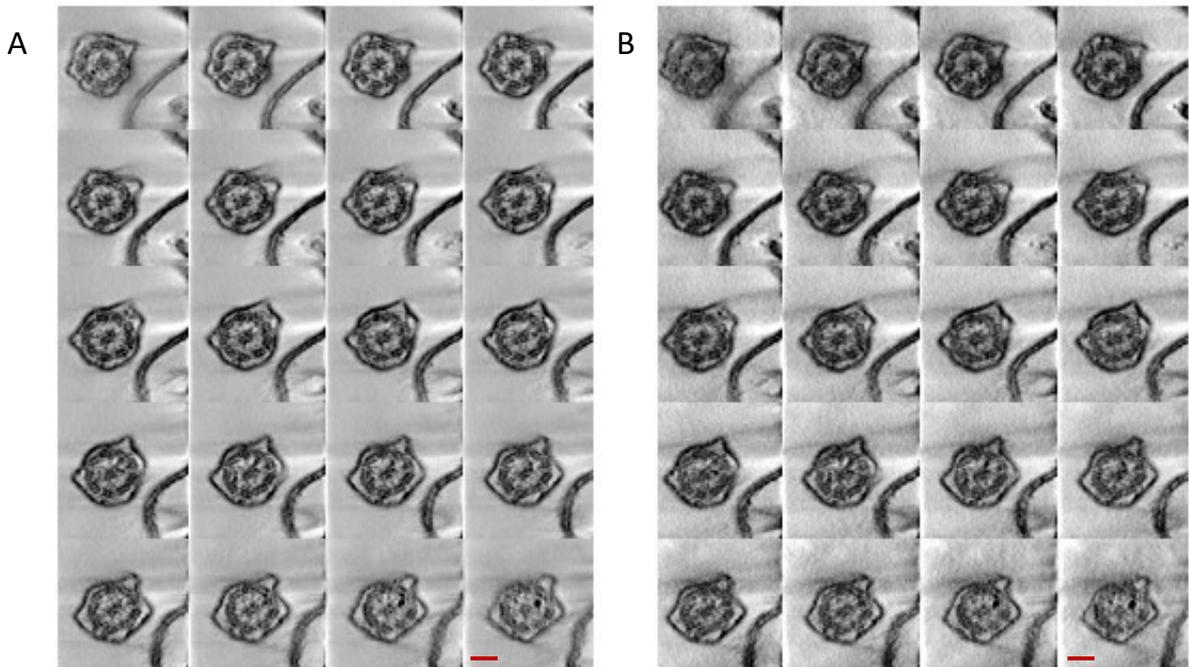


FIGURE 2.10 – Reconstructions tomographiques de séries d’inclinaisons acquises en STEM (BF) sans et avec l’utilisation d’un filtre en énergie. La série d’inclinaisons (A) a été acquise sans ajout du filtre Oméga, la série d’inclinaisons (B) a quant à elle été acquise avec le filtre ayant un écartement de fente de 20eV. Les deux séries ont été acquises en même temps. Pour chaque angle le filtre à perte d’énergie (20 eV) a été inséré puis retiré. Chaque représentation (A et B) ne contient qu’une partie des images de chaque reconstruction (97 images), soit 1 image sur 5. La barre d’échelle (en rouge) dans chaque série correspond à 150 nm.

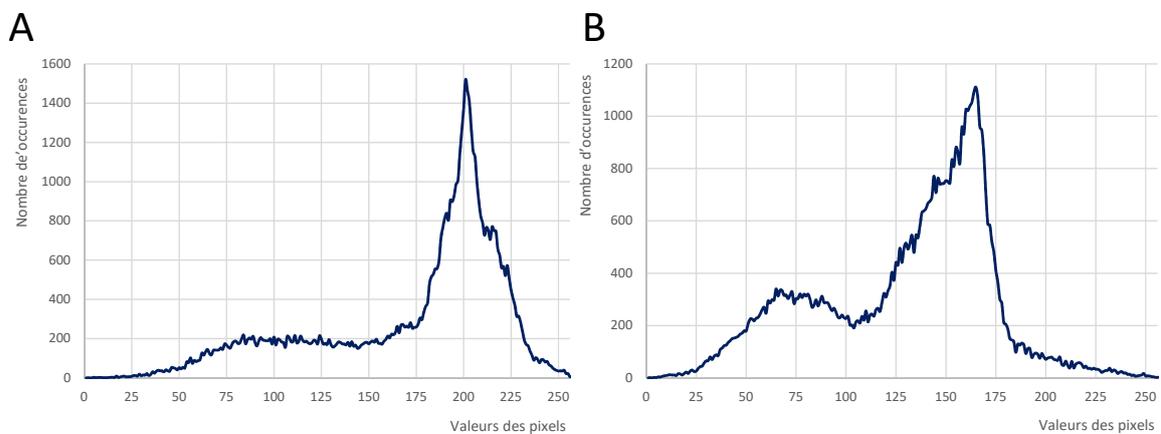


FIGURE 2.11 – Histogramme de deux reconstructions obtenues à partir d’une série d’inclinaisons non filtrée (A) et d’une série d’inclinaison filtrée en énergie (B).

2.4 Conclusion

Les résultats obtenus montrent l'importance de la caractérisation du microscope utilisé pour la combinaison du filtre à perte d'énergie et l'acquisition STEM. Une fois ces conditions établies, on peut démontrer que la combinaison des deux méthodes amène à une amélioration des images des échantillons biologiques inclus dans une résine époxy ou hydratés et congelés. Néanmoins, malgré l'amélioration évidente qu'elle apporte selon le gain de SNR, elle ne semble pas être suffisante pour que son effet devienne visuellement évident. D'autre part, son application à la tomographie électronique nécessite une optimisation dans le processus d'acquisition afin d'éviter le décalage de la fente lors de l'inclinaison de l'échantillon dans le microscope. Un recentrage automatique du *zero loss* pourrait améliorer la situation mais nécessite un développement futur sur le microscope. En conclusion, l'approche EF-STEM, bien que prometteuse, nécessite des développements spécifiques qui étaient en dehors des objectifs de cette thèse.

Chapitre 3

Comparaison d'algorithmes de détection de points caractéristiques pour un alignement sans marqueur

Article associé en annexe (Annexe B)

Comparison of methods based on feature tracking for fiducial-less image alignment in electron tomography

Verguet Amandine, Marco Sergio et Messaoudi Cédric.

En révision depuis juillet 2019.

3.1 Problématique

L'alignement est une étape importante du processus de reconstruction 3D d'un tomogramme. En effet, les algorithmes de reconstruction nécessitent l'utilisation des images de projection. Celles-ci doivent être inclinées autour d'un axe sans décalage ni déformation, tel qu'expliqué dans le chapitre 1. Les méthodes d'acquisition actuelles, bien que performantes, ne compensent pas totalement les dérives mécaniques induites par l'instrument. Dans ce cas il est nécessaire d'appliquer un alignement post-acquisition pour pouvoir obtenir une reconstruction précise de l'objet d'intérêt.

Les premières méthodes d'alignement précédemment décrites se basent sur la corrélation croisée globale ou utilisent des marqueurs externes insérés dans l'échantillon, afin de réaliser le suivi des images de la série inclinée (*tilt-series*). La figure 3.1 propose une vue d'ensemble des différentes méthodes d'alignement d'image existantes et des algorithmes qui composent leurs étapes. Chaque méthode possède ses limitations. La corrélation croisée globale par exemple ne peut prendre en compte que des transformations simples, ce qui induit un risque de propagation cumulative d'erreurs entre les images de la série.

La bille d'or est souvent utilisée comme marqueur physique. Il s'agit d'un objet sphérique d'un diamètre connu et de haute densité qui peut être facilement suivi d'image en image. Cependant dans certains cas, aucun ajout ne peut être réalisé, ou leur répartition n'est pas homogène dans l'échantillon. Ceci induit une absence de marqueur dans la zone imagée. Malgré tout, l'alignement des tomogrammes de ces échantillons reste essentiel. Pour réaliser cette opération il existe des méthodes dites de *patch-tracking* (Castaño-Díez et al., 2010; Sorzano et al., 2009; Winkler and Taylor, 2006) qui n'utilisent pas de marqueurs. A partir d'un calcul de corrélation croisée locale, il est possible de suivre des points dans l'image. Dans un cas comme dans l'autre, les coordonnées

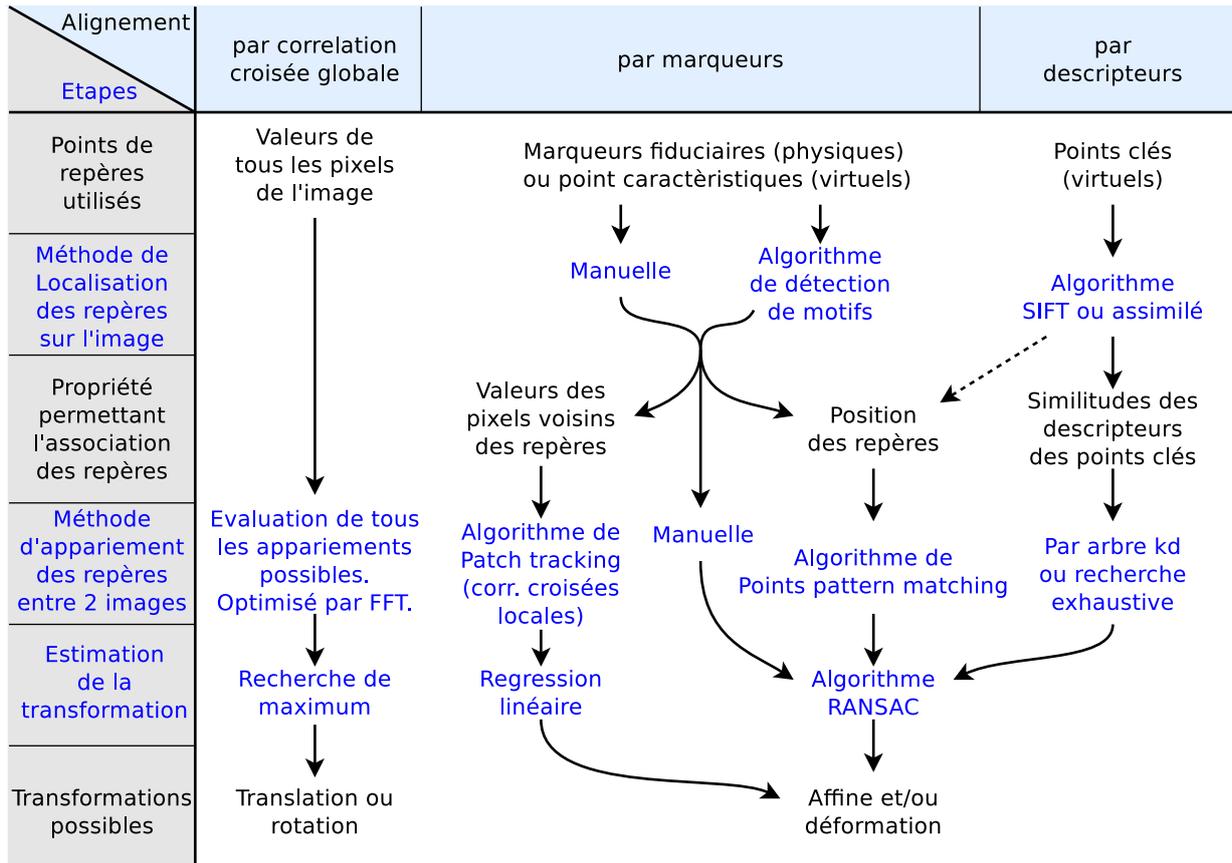


FIGURE 3.1 – Etapes des différents processus existants d’alignement d’image

des points de repères obtenues sont exploitées pour déterminer la transformation nécessaire à l’alignement. Enfin, les images sont corrigées avant la reconstruction.

Proposé par David Lowe (Lowe, 2004) en 2004, l’algorithme SIFT (Scale Invariant Feature Transform) est conçu pour de détecter des motifs ou des objets dans des vidéos. Il s’agit d’une méthode sans marqueurs externes qui permet de détecter automatiquement des points caractéristiques dans une image. Il s’agit d’extrema locaux, obtenus à l’aide d’un calcul pyramidal de différences de Gaussienne (DoG). La méthode a été précédemment introduite dans le chapitre 1. Les algorithmes basés sur les méthodes de *patch-tracking* n’utilisent que les coordonnées des points caractéristiques présents dans une image, pour tenter de trouver ces mêmes points aux mêmes coordonnées sur les autres images. La localisation est alors affinée par corrélation croisée. Dans le cas présent, une fois détectés, les points sont ensuite décrits à partir de leur voisinage, sous la forme d’un vecteur unique. Les vecteurs ainsi obtenus pour chaque point de chaque image peuvent alors être comparés et appariés directement.

En 2014, Han *et al* (Han et al., 2014) ont présenté la possibilité d’utiliser ce type d’algorithme pour l’alignement de séries inclinées en tomographie électronique. Cependant, ces dernières années ont vu l’émergence d’algorithmes similaires à SIFT, basés sur la détection de points caractéristiques pour la détection de motifs, tels que SURF (Bay et al., 2008), ORB (Rublee et al., 2011), BRISK (Leutenegger et al., 2011), KAZE (Alcantarilla et al., 2012) et AKAZE (Alcantarilla et al., 2013).

Nous nous sommes demandés si ces algorithmes sont plus performants que SIFT pour l’alignement de séries d’inclinaisons issues d’échantillons biologiques acquises en microscopie électronique en transmission.

3.2 Approche expérimentale

Afin d'estimer l'efficacité de reconstruction en tomographie électronique, nous avons sélectionné les algorithmes actuellement implémentés et disponibles dans la bibliothèque *OpenCV* (Bradski, 2000).

Une première évaluation en 2D sur une série d'images acquises à différents angles d'inclinaisons a été réalisée en utilisant différents algorithmes. Le but de l'étude est d'évaluer la qualité des méthodes de détection et d'appariement des points obtenus sur des tomogrammes, ainsi que le temps de calcul associé. Pour cela, les implémentations *OpenCV* des algorithmes suivants ont été utilisées :

- SIFT (Lowe, 2004), détaillé dans le chapitre 1, sera ici considéré comme la référence pour ce type d'algorithme.
- SURF (Bay et al., 2008), qui a été conçu pour être une approche de SIFT plus rapide, utilise une matrice Hessienne et se base donc sur les gradients pour trouver les points d'intérêt. Il s'agit aussi d'un des algorithmes les plus répandus dans le domaine de la détection de points.
- BRISK (Leutenegger et al., 2011) utilise un détecteur FAST (Feature from Accelerated Segment Test) (Rosten and Drummond, 2006) puis construit des descripteurs binaires pour chaque point. Les descripteurs binaires sont des vecteurs de booléens simples à comparer.
- ORB (Rublee et al., 2011) possède des similitudes avec SIFT et BRISK. Il utilise l'algorithme de détection de coins Harris corner et propose un descripteur binaire.
- KAZE (Alcantarilla et al., 2012) utilise des filtres non-linéaires pour la création de pyramides à différentes échelles lors des étapes de détection de points et lors de la création de son descripteur. Le descripteur est basé sur le mécanisme de SURF.

Suite à cette évaluation, une nouvelle sélection d'algorithmes a été réalisée afin d'étudier leur robustesse pour l'alignement sur des séries tomographiques. Nous avons éliminé l'algorithme SURF de l'ensemble testé et ajouté l'algorithme AKAZE (Alcantarilla et al., 2013). AKAZE, pour *Accelerated KAZE* est la version accélérée de KAZE. Nous avons à nouveau évalué la qualité de l'appariement, ainsi que le temps de calcul de chacun de ces algorithmes, cette fois-ci jusqu'à la reconstruction 3D.

3.2.1 Les différentes étapes du processus

On définira ici les différentes étapes depuis la détection des points pour chaque image de la série d'inclinaisons, jusqu'à sa reconstruction qui permettra ensuite la comparaison des algorithmes cités ci-dessus.

3.2.2 Détection de points caractéristiques

Dans un premier temps, on cherche à détecter des points d'intérêt dans les images de la série inclinée, en utilisant un algorithme de détection de points caractéristiques comme par exemple les extrema locaux par DoG (SIFT) ou encore les coins (Harris corner) avec FAST. A chaque point détecté dans une image est associé un descripteur unique. En appliquant le même algorithme de détection de points caractéristiques sur deux images similaires, les points trouvés sont pour la plupart les mêmes, avec un environnement quasi identique et les descripteurs correspondants sont donc très similaires.

3.2.3 Appariement entre les points détectés

Ensuite, afin de valider les points obtenus entre les différentes images, il convient de tester l'appariement entre ces points (*matching*). L'appariement des points détectés, à partir de deux images, est effectué en calculant la différence entre les deux descripteurs. Le calcul de la différence se fait différemment selon le type de descripteur. Lorsque le descripteur est un vecteur de valeurs

réelles ou entières (SIFT, SURF, KAZE), les algorithmes utilisent la distance Euclidienne. Lorsqu'il s'agit d'un descripteur binaire comme dans les algorithmes ORB, BRISK ou AKAZE, la distance de Hamming est utilisée. La distance de Hamming est définie par le nombre de bits différents entre les deux vecteurs binaires et peut être calculée très rapidement.

Dans les approches décrites, l'appariement des points caractéristiques entre deux images est effectué en utilisant l'appariement dit « brute-force ». Cet appariement compare chaque descripteur de l'image de référence à chaque descripteur de l'autre image. Afin de valider un appariement, Lowe propose pour SIFT (Lowe, 2004) l'utilisation de l'algorithme « Best-bin-first » (Beis and Lowe, 1997). Cela consiste en l'obtention des 2 meilleures correspondances pour chaque point caractéristique et à calculer le rapport entre les distances euclidiennes des descripteurs correspondants. Si le rapport est supérieur à un seuil défini par l'utilisateur, la correspondance est validée.

Une autre possibilité est d'utiliser un processus de validation croisée. Ce processus vérifie si la meilleure correspondance d'un point caractéristique de l'image numéro 1 se trouve dans l'image numéro 2 et réciproquement. Cette méthode est utilisée par tous les autres algorithmes et peut également être utilisée avec SIFT.

Déterminer la transformation entre deux images en utilisant les paires de points permet d'éliminer les appariements aberrants. Il est possible de déterminer cette transformation à l'aide de l'algorithme RANSAC (Fischler and Bolles, 1981) introduit dans le chapitre 1. Dans la bibliothèque *OpenCV*, la transformation calculée est une homographie qui prend en compte les effets de perspective. Les paires de points distants de la transformation obtenue sont éliminées.

3.2.4 Suivi de points entre les différentes images de la série

Les paires de points obtenues à l'étape précédente ne peuvent être utilisées en l'état. En effet, l'alignement des séries d'inclinaisons est basé sur des chaînes de points caractéristiques détectés sur de nombreuses images servant à produire un modèle d'alignement 3D. Par conséquent, l'objectif est maintenant de transformer ces paires en chaînes de points caractéristiques visibles sur de nombreuses images qui se suivent dans la série.

Ce chaînage s'effectue comme suit : une chaîne de points caractéristiques est créée en utilisant une paire de points présents dans l'image n et l'image $n + 1$. La chaîne est ensuite agrandie en déterminant si un point dans l'image $n + 1$ correspond à un point de l'image $n + 2$. Le point caractéristique trouvé dans l'image $n + 2$ est ensuite recherché dans l'image $n + 3$ et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de correspondance de ce point caractéristique sur l'image suivante, terminant ainsi la chaîne.

Cette procédure est répétée pour tous les appariements à partir de la première image. On effectue ensuite à nouveau cette étape, en reprenant à l'image suivante de la série d'inclinaisons, à partir des points qui ne sont pas encore assignés à une chaîne. Sachant que certains points caractéristiques peuvent éventuellement ne pas être détectés sur certaines images, la possibilité d'un saut a été envisagé. Ainsi, on vérifie si une correspondance sur une image plus éloignée existe. Lors d'un saut, l'appariement est facilité grâce à l'utilisation des descripteurs au lieu des coordonnées des points. Finalement, seules les chaînes ayant une taille minimale sont conservées.

3.2.5 Alignement et reconstruction 3D

Les chaînes sont ensuite utilisées comme entrée de l'algorithme d'alignement défini selon le modèle 3D implémenté dans TomoJ (Messaoudi et al., 2007; Sorzano et al., 2009). La reconstruction est alors réalisée avec l'algorithme SART (Andersen and Kak, 1984) qui est une variante de ART (chapitre 1), en utilisant les paramètres suivants : 20 itérations et un coefficient de relaxation de 0,1. Ce coefficient permet de limiter la vitesse de convergence de l'algorithme, afin d'obtenir un meilleur résultat. En effet, si le coefficient est trop grand, l'algorithme devient instable, la valeur choisie assure la stabilité numérique.

3.3 Résultats

Différents paramètres ont été comparés pour chaque algorithme et les informations obtenues sont présentées dans l'article proposé en annexe B.

Le tableau 1 de l'article présente la variation du nombre de points d'intérêt obtenus après l'étape de détection. Il indique aussi le temps d'exécution de cette étape et de la création du descripteur. Les différentes valeurs du temps d'exécution sont estimées sur la moyenne de 100 tests consécutifs. Les paramètres par défaut de chaque algorithme sont utilisés pour cette application 2D. L'intérêt est d'évaluer l'application de ces algorithmes sur des images acquises en TEM consécutivement (soit un angle de 2° entre deux images) et des images séparées par 9 images (soit un angle de 20° entre les deux images).

Une fois les points d'intérêt obtenus, la deuxième étape est la recherche des correspondances entre les paires d'images (tableau 2 de l'article). Les résultats d'appariement des différents algorithmes se présentent ainsi : pour deux images consécutives on obtient un taux de 70% entre les bonnes correspondances et le nombre total de correspondances. Pour deux images séparées de 9 images, on constate une diminution importante du rapport, avec au mieux un taux de correspondance supérieur à 10% pour KAZE et BRISK.

L'analyse 2D a démontré que le descripteur SIFT permet d'obtenir de bons résultats avec un temps de calcul important. SURF et ORB sont plus rapides que SIFT (tableau 1 de l'article), mais leur stabilité n'est pas aussi bonne comparativement à SIFT. Ceci a été mis en évidence par le rapport des bonnes correspondances avec des images inclinées de 20° (tableau 2 de l'article). BRISK et KAZE ont affiché une meilleure stabilité que SIFT (tableau 2 de l'article), BRISK étant le plus rapide et KAZE étant le plus lent de tous les algorithmes (tableau 1 de l'article).

Pour l'analyse 3D, nous avons décidé de concentrer nos efforts sur SIFT, comme référence pour les approches basées sur les points caractéristiques, ainsi que sur BRISK et ORB pour l'intérêt de leurs descripteurs binaires et leurs rapidités d'exécution. KAZE est le meilleur algorithme mais il est toutefois très lent. Il est conservé pour la suite de l'étude, et AKAZE sa variante accélérée (Alcantarilla et al., 2013) est ajoutée. Nous introduirons aussi deux méthodes souvent utilisées en tomographie électronique, basées sur un suivi local.

Les tests 3D de détection, associés à une méthode d'alignement ont été ensuite validés par une reconstruction des volumes. La série de projection utilisée a été réalisée à partir d'un échantillon biologique de *Trypanosoma brucei* (cils) inclus en résine (epon) (Trépout et al., 2018), acquise sur un microscope JEM 2200FS en mode STEM bright field. Les angles de la série d'inclinaisons vont de -75° à +77° pour un nombre total de 97 images. Les informations de taille en pixel de l'image, de grossissement et de prétraitement sont détaillées dans l'article en Annexe.

Les algorithmes ont été testés en utilisant les paramètres suivants :

- une longueur minimale des chaînes de 15 images avec un saut maximum autorisé entre les images de 5 images,
- une précision de validation homographique de 5 pixels,
- l'application d'une méthode de validation croisée pour la validation de l'appariement.

Pour comparer les performances intrinsèques des différents algorithmes, les paramètres ont été ajustés comme indiqué dans l'article et les scores d'alignement obtenus sont indiqués dans le tableau 3 présenté dans l'article en annexe B.

Le pseudo-code effectuant le chaînage proposé est présenté dans l'algorithme 1. D'un point de vue informatique, un chaînage rapide des points caractéristiques a été obtenu en stockant les correspondances dans des tables de hachage afin de permettre un enchaînement facile dans la recherche de correspondances entre n'importe quelle paire de point caractéristique.

En résumé, SIFT a obtenu le meilleur score avec une erreur moyenne entre les coordonnées de projection des repères 3D et les coordonnées des repères détectés en dessous de 1 pixel. BRISK, AKAZE et la méthode de *patch-tracking* sont classées ensuite avec un score légèrement supérieur à 1 pixel. ORB et KAZE ont cumulé des erreurs et obtenus un score d'environ 1,35 pixel. *Grid* obtient le moins bon score avec 2.37 pixels.

Algorithm 1 Pseudo-code of chain creation with jump**Require:** Array of list of features matches between two images

```

1:  $jump = 1$ 
2:  $start = startImage$ 
3: for  $match$  in  $arrayOfList[i]$  do
4:   Extract( $feature1$ )
5:   Extract( $feature2$ )
6:   CreateChain( $start, feature1$ )
7:   while ( $feature2 \neq null$ ) do
8:     AddFeatureToChain( $start + jump, feature2$ )
9:      $start = start + jump$ 
10:     $feature1 = feature2$ 
11:   repeat
12:      $feature2 = FindMatch(feature1, start + jump)$ 
13:      $jump++$ 
14:   until ( $feature2 \neq null$ ) || ( $jump > jumpMax$ )
15: end while
16: end for

```

Quant au temps de calcul (tableau 3 de l'article), SIFT a nécessité plus de deux heures pour calculer l'alignement à l'aide d'un seul fil de comparaison, alors que toutes les autres approches ont pris moins d'une heure. L'approche la plus rapide est AKAZE avec seulement 35 minutes. Cependant, en étudiant la proportion de bonnes chaînes de points de repère (tableau 3 de l'article), BRISK, SIFT et ORB montrent un rapport impressionnant de 92-93% de chaîne valides. En comparaison, les méthodes de *patch-tracking* et *Grid* ont un ratio de 18%. Pour classer les différents algorithmes efficacement, un score a été créé en ajoutant les rangs dans le temps de calcul, le score d'alignement et la proportion de bonnes chaînes.

Par ailleurs, nous avons réalisé des tests additionnels afin de valider la robustesse des algorithmes vis à vis du bruit. Dans un premier temps, nous avons ajouté un même niveau de bruit gaussien sur l'ensemble des images de la série. Plusieurs niveaux de bruit ont été testé entre 5% et 30% (figures 3.2 et 3.3).

Puis dans un second temps, nous avons appliqué du bruit gaussien avec un niveau aléatoire sur chaque image de la série. Deux simulations ont été réalisées avec des valeurs aléatoires comprises entre 0 et 5% et entre 0 et 10% (figures 3.4 et 3.5).

L'analyse qualitative des reconstructions pour chacun des algorithmes a été synthétisée dans le tableau 3.1. La figure 3.2 permet de visualiser certains des résultats exprimés dans le tableau 3.1.

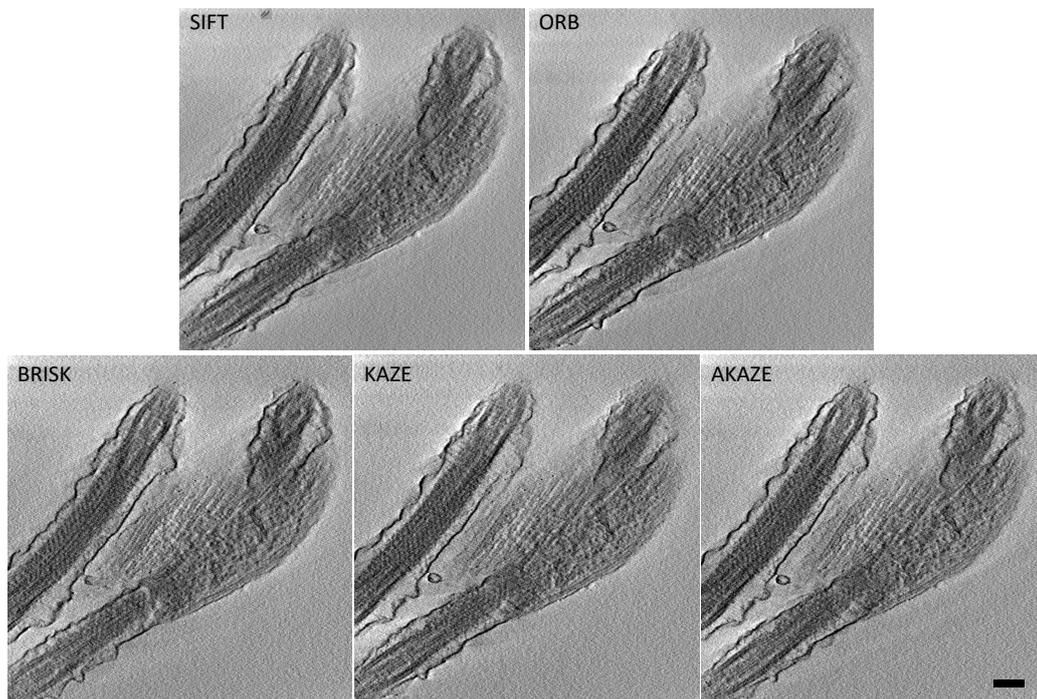


FIGURE 3.2 – Reconstructions obtenues en utilisant les différents algorithmes de détection, avec divers niveaux de bruit gaussien (de 5 à 30%) appliqués à l'indentique sur toutes les images dans une même série. Les images montrent le plan XY du volume reconstruit d'un échantillon de *Trypanosoma brucei* acquis en STEM. Il a été possible de réaliser des reconstructions qualitatives avec un bruit gaussien maximum de 20% appliqué sur chaque image de la série pour les algorithmes de détections SIFT et ORB. Par ailleurs, BRISK, KAZE et AKAZE ont obtenu des reconstructions qualitatives pour un bruit gaussien maximum de 30% appliqué sur chaque image de la série. La barre d'échelle représente 200nm.

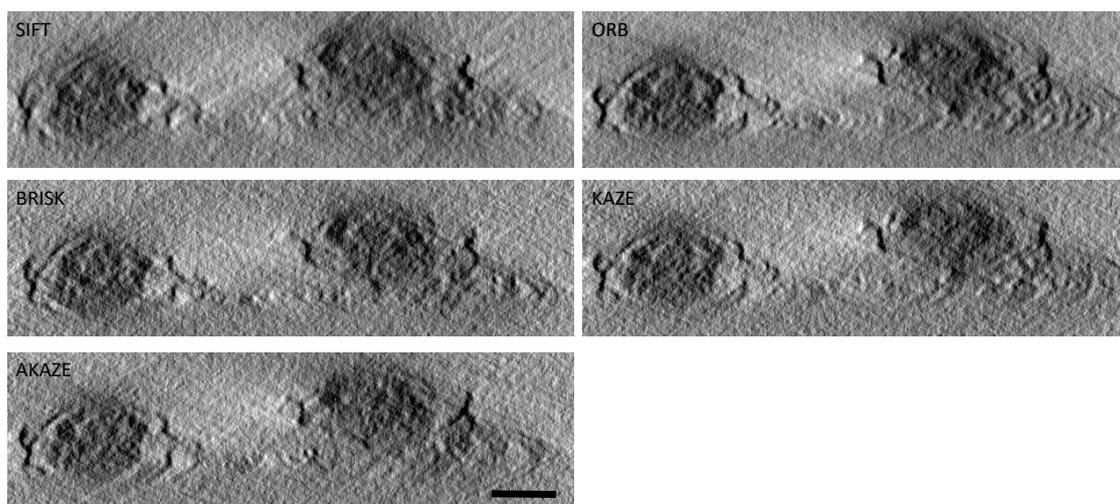


FIGURE 3.3 – Les images montrent le plan XZ du volume reconstruit d'un échantillon de *Trypanosoma brucei* acquis en STEM. Les mêmes remarques que pour le plan XY du volume présenté dans la figure 3.2 s'appliquent. La barre d'échelle représente également 200nm.

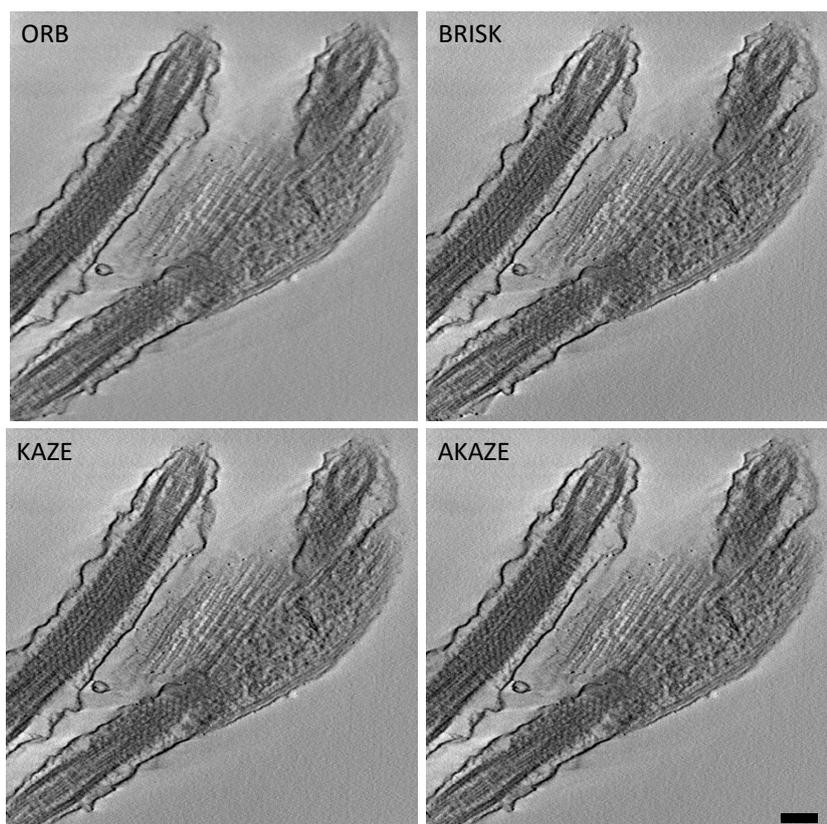


FIGURE 3.4 – Reconstructions obtenues en utilisant les différents algorithmes de détection, avec des niveaux de bruit gaussien compris entre 0 et 10%, appliqués de façon aléatoire pour chaque image dans les séries. Les images montrent le plan XY du volume reconstruit d'un échantillon de *Trypanosoma brucei* acquis en STEM. SIFT est absent car il a été impossible de détecter des points sur plusieurs images à fort angles. Pour la reconstruction obtenue avec BRISK, il a été nécessaire de retirer une image de la série sur laquelle aucun point n'a été détecté. La barre d'échelle représente 200nm.

	Niveau maximum de bruit gaussien appliqué à chaque image de la série	Bruit Gaussien variable entre les images de la série	
		5	10
SIFT	20%	+	/
BRISK	30%	+++	+++
ORB	20%	++	++
KAZE	30%	+++	+++
AKAZE	30%	+++	+++

TABLEAU 3.1 – Estimation qualitative des reconstructions obtenues à partir des différents algorithmes de détections en fonction du bruit gaussien ajouté. Chaque algorithme a été testé sur une série bruitée pour différentes valeurs de bruit allant de 5 à 30%. On observe ici la valeur maximale de bruit continu pour laquelle la reconstruction a été validée qualitativement. Concernant le bruit gaussien aléatoire, il s'agit d'une estimation qualitative des reconstructions pour chacun des algorithmes utilisés. Pour la série obtenue à partir d'un bruit gaussien compris entre 0 et 10%, l'algorithme SIFT n'a pas donné de résultats. Pour SIFT, l'absence de chaînes sur les images à forte inclinaison a rendu impossible l'obtention d'un alignement. Dans le cas de BRISK, nous avons observé une grande variabilité au niveau de la détection des points due à la différence de bruit d'une image à l'autre.

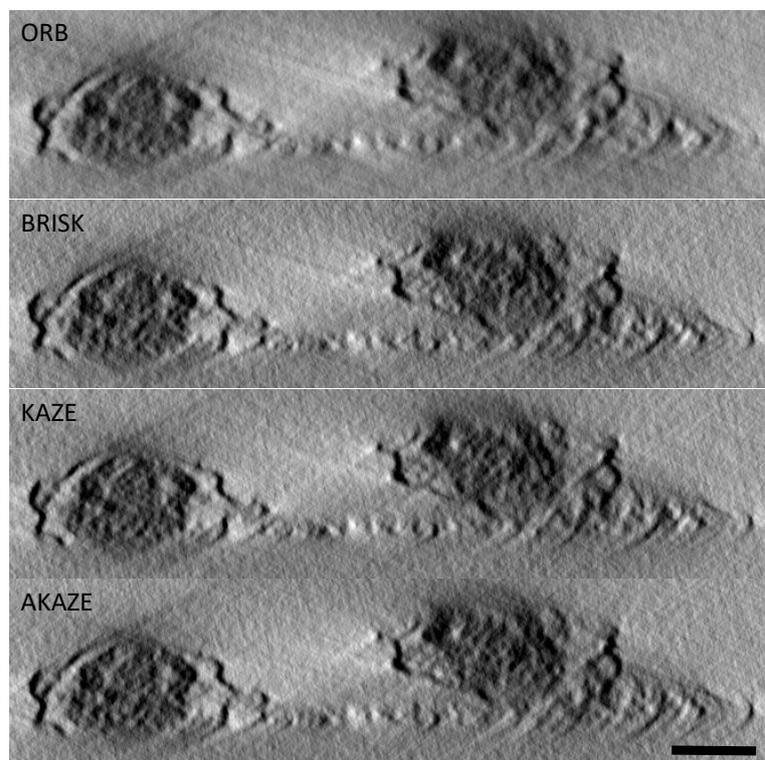


FIGURE 3.5 – Les images montrent le plan XZ du volume reconstruit d'un échantillon de *Trypanosoma brucei* acquis en STEM. Les mêmes remarques que pour le plan XY du volume présenté dans la figure 3.4 s'appliquent. La barre d'échelle représente également 200nm.

3.4 Conclusion

Les tests effectués ont montré que déterminer les bons paramètres pour chacun des différents algorithmes est une tâche complexe. Chacun des algorithmes présente un nombre variable de paramètres, entre 2 et 8. Je propose ici une synthèse des points forts des algorithmes étudiés dans ce chapitre. SIFT, comme annoncé par Han *et al*, a été efficace pour aligner les images et ainsi obtenir une bonne reconstruction, il en va de même pour les différents algorithmes testés. Cependant, les algorithmes AKAZE et BRISK se distinguent sur les images standards par leur qualité et leur temps d'exécution. BRISK permet d'obtenir des reconstructions de qualité. Toutefois, dans le cas d'images avec un SNR variable, il est difficile d'ajuster le paramètre principal. En effet, le nombre de points détectés devient très inconstant d'une image à l'autre (entre 2500 et 90000 points détectés). En présence de bruit, SIFT ne semble toutefois pas être le plus performant. KAZE reste très stable malgré un temps d'exécution plus long. Pour AKAZE, sa version accélérée permet de trouver facilement et rapidement un alignement de qualité. ORB a donné jusqu'à présent des résultats médians, les reconstructions obtenues sont correctes pour un temps d'exécution moyen comparé aux autres algorithmes. Il est le plus complexe à paramétrer, et nécessite donc un certain temps d'apprentissage afin d'obtenir un résultat équivalent aux autres. Ses nombreux paramètres peuvent cependant lui permettre de mieux s'adapter aux différents échantillons contrairement à BRISK.

Pour conclure, malgré le fait que SIFT convienne à notre usage, les différents résultats obtenus suggèrent que AKAZE et KAZE sont de bonnes alternatives car ils sont plus robustes vis à vis du bruit, stables sur la détection et faciles à paramétrer.

Chapitre 4

Outils pour le contraste de phase

Lorsque les échantillons sont de petite taille, ou que leur composition chimique est proche de celle du milieu qui les entoure, le contraste d'amplitude que l'on obtient avec un TEM peut être insuffisant pour les observer. Dans ce cas, l'utilisation du contraste de phase devient une alternative pour obtenir des informations autrement inaccessibles. En science des matériaux, le contraste de phase est couramment utilisé pour l'imagerie à haute résolution. En biologie, on peut citer le cas des observations d'objets de faible densité par cryo-TEM.

Comme présenté dans l'introduction, la *phase plate* permet d'exploiter le contraste de phase présenté par l'échantillon, de même que la méthode par défocalisation. Dans ce chapitre, nous présenterons : une étude préliminaire d'application de *phase plate* pour la biologie, pouvant éventuellement être combiné avec le filtre à perte d'énergie, ainsi qu'un développement logiciel proposant une méthode simplifiée de reconstruction de la phase à partir d'images défocalisées.

4.1 *Phase Plate*

Dans le but de réaliser une étude comparative sur des échantillons biologiques, entre les résultats obtenus avec une *phase plate* et ceux par combinaison d'images défocalisées, il était prévu que, durant ma thèse, soit installé une *phase plate* de type HFPP (*Hole Free Phase Plate*) sur le microscope JEM-2200FS du laboratoire. Cependant, en raison de la nouveauté du produit, des retards d'installation et de formation ont rendu ces tests trop tardifs pour réaliser une étude approfondie de cette approche. Par conséquent, les données présentées ci-dessous correspondent uniquement aux résultats préliminaires obtenus après l'installation de la HFPP.

La figure 4.1 présente plusieurs images d'une grille de calibration en or (*Au grating grid*) acquises selon différents modes :

- acquisition TEM standard qui servira de référence (figure 4.1 A),
- acquisition avec le filtre oméga à perte d'énergie (figure 4.1 B),
- acquisition avec la HFPP (figure 4.1 C) et enfin
- acquisition avec la HFPP et le filtre oméga (figure 4.1 D).

On a choisi comme échantillon de référence, une zone présentant une déchirure dans une grille de calibration en or, afin de faciliter les comparaisons entre images acquises. Les images A, B, C et D de la figure 4.1 montrent le résultat des différentes acquisitions. La zone déchirée présente un intérêt pour analyser la dose d'électrons reçue. Cette analyse est réalisée à partir des histogrammes de niveau de gris des zones marquées par un carré, présents dans les différentes parties de la figure.

Sur la grille, les billes d'or sont visibles et sont utilisées pour la comparaison des différents modes d'acquisition ainsi que pour l'évaluation du contraste observé dans chaque cas. Pour cela, deux particules ont été repérées (voir agrandissement figure 4.1), leur profil d'intensité a été réalisé sur les différentes images et est présenté dans la partie E.

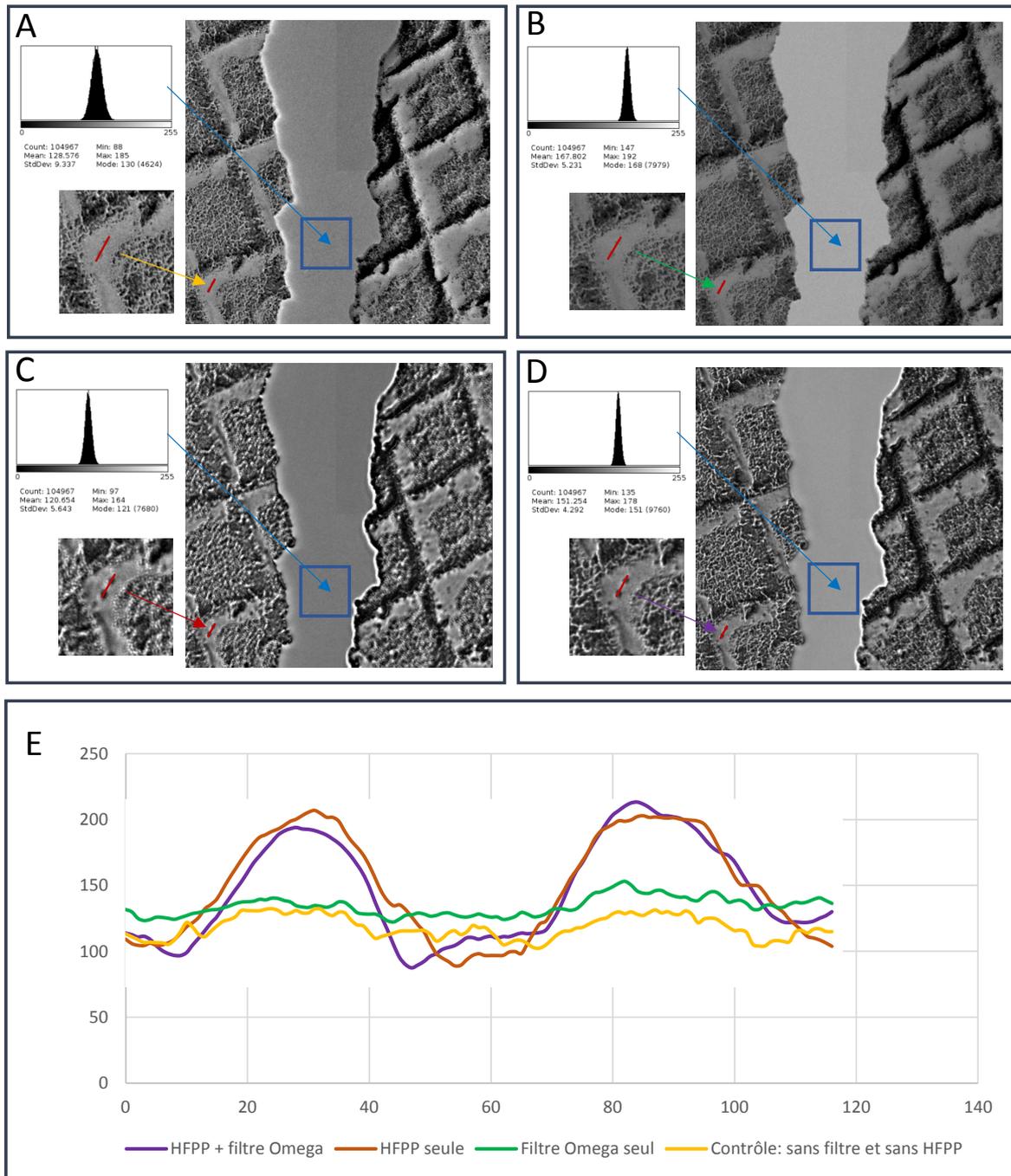


FIGURE 4.1 – Comparaison d’acquisitions TEM, EF-TEM, et *phase plate* sur une grille de calibration en or (Au grating grid). Chaque condition comprend : une image acquise en TEM, un histogramme correspondant à la zone de fond de l’image (carré bleu), un agrandissement de l’image sur une zone d’intérêt contenant des billes d’or, ainsi que le profil (partie E) de deux billes (ligne rouge). Le partie A correspond à une acquisition standard en TEM (image de référence). La partie B correspond à une acquisition en TEM avec insertion du filtre à perte d’énergie. La partie C correspond à une acquisition en TEM avec le *phase plate* et celle de la partie D combine l’utilisation de la *phase plate* et du filtre à perte d’énergie. Le graphique E correspond aux profils de l’intensité des valeurs des pixels (ordonnée) en fonction de la position (abscisse) dans les lignes rouges des parties A (profil jaune), B (profil vert), C (profil rouge) et D (profil violet).

La région correspondant à la déchirure a été utilisée pour étudier les caractéristiques du faisceau d'électrons lors de l'acquisition en utilisant l'histogramme des niveaux de gris. En effet, il existe des coefficients permettant de caractériser la forme d'un histogramme par rapport à une distribution gaussienne. Ceux-ci sont : le coefficient d'asymétrie (*skewness*) et le coefficient d'aplatissement (*Kurtosis*). Le coefficient d'asymétrie Sk décrit par l'équation (4.1) évalue la symétrie d'une distribution gaussienne. Par exemple, la valeur est négative pour une distribution étalée à gauche. Le coefficient d'asymétrie est défini comme le moment d'ordre 3 d'une variable centrée réduite x , appliqué ici à une somme de n réalisations :

$$Sk = \frac{1}{\sigma^3} \frac{\sum (x_i - \mu)^3}{n} \quad (4.1)$$

en considérant x une variable aléatoire de moyenne μ et d'écart type σ .

Le coefficient d'aplatissement normalisé défini par l'équation (4.2) permet quant à lui d'évaluer la dispersion des valeurs dites extrêmes, en comparaison à une distribution suivant la loi normale, soit la "hauteur" de la distribution. Dans le cas d'une distribution normale la valeur de Kurtosis est $K = 3$. On notera dans l'équation (4.2) la soustraction du facteur 3, ce qui permet d'avoir la valeur d'aplatissement de la loi normal à $K = 0$ et d'en faire une référence. Ainsi, lorsque le coefficient d'aplatissement est supérieur à 0, la distribution présente une forme pointue au niveau de la moyenne.

$$K = \frac{1}{\sigma^4} \frac{\sum (x_i - \mu)^4}{n} - 3 \quad (4.2)$$

où X une variable aléatoire de moyenne μ et d'écart type σ .

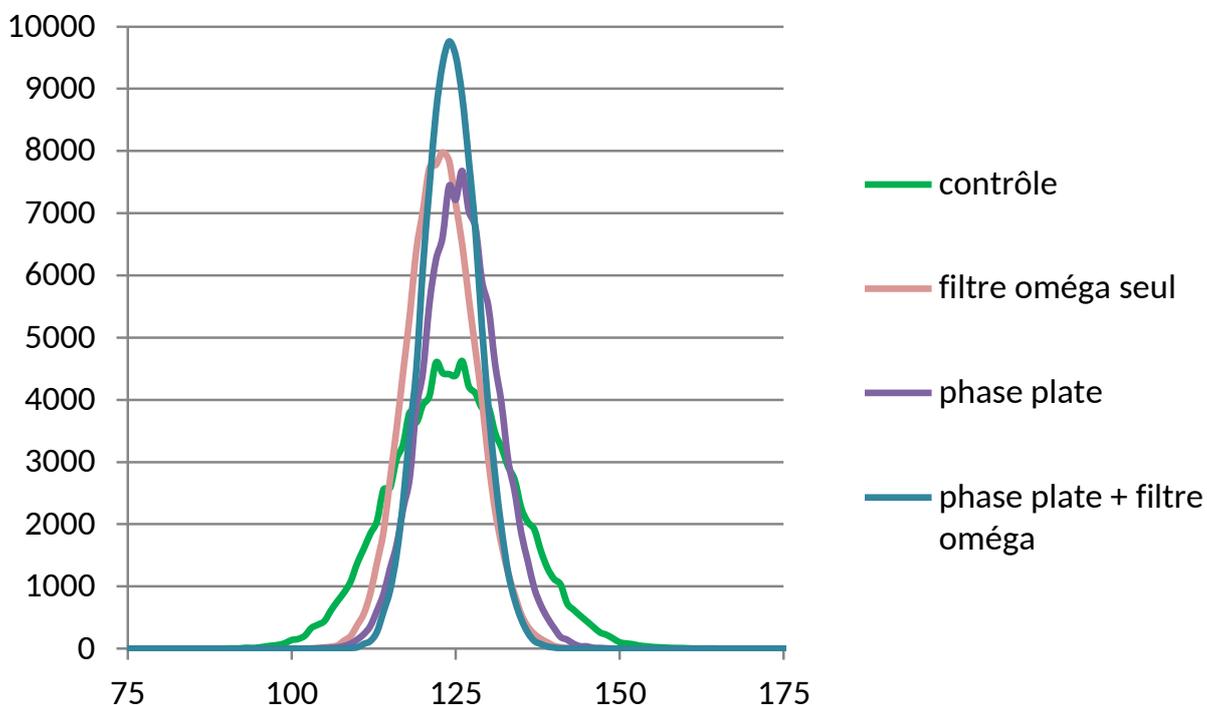


FIGURE 4.2 – Superposition des histogrammes des images acquises dans une région sans échantillon. L'axe des abscisses correspond aux valeurs des pixels et l'axe des ordonnées correspond au nombre d'occurrence de chaque valeur dans l'image. L'utilisation de la *phase plate*, du filtre oméga ou de leur combinaison permet d'observer un signal plus cohérent. En effet la dispersion des valeurs est plus petite, autour de la moyenne, par rapport à la référence.

Analyses	Contrôle	Filtre oméga	HFPP	HFPP + filtre à perte d'énergie
Skewness	3	4	4	4
Kurtosis	6	15	14	19

FIGURE 4.3 – Analyse de la distribution des histogrammes de la région en l'absence d'échantillon

L'analyse des histogrammes sur une région de fond sans échantillon (figure 4.2) permet d'observer que, dans tous les cas, la distribution des électrons est symétrique autour d'une moyenne de façon similaire (tableau 4.3). Cependant, si on analyse l'aplatissement de ces mêmes distributions, on observe une forme plus pointue ($K = 15$) quand le filtre oméga est utilisé par rapport à l'image de référence ($K = 6$). Ceci est lié au fait que l'on augmente la cohérence en énergie des électrons en supprimant les électrons inélastiques. On remarque qu'avec la *phase plate* les caractéristiques de la courbe obtenue (skewness et kurtosis $K=14$) sont voisins de ceux obtenus précédemment avec le filtre oméga.

Lorsque le filtre oméga est combiné à la *phase plate*, les caractéristiques sont meilleures. En effet, la valeur de K est plus élevée ($K=19$) ce qui indique que le faisceau est encore plus cohérent. La question se pose alors des conséquences possibles de cette combinaison sur les images. Pour cela, on peut calculer le contraste local de la zone bleu des figures 4.1 A, B, C et D, en utilisant la loi de *Weber-Fechner* (équation 4.3).

$$Cw = \frac{L_{zone1} - L_{fond}}{L_{fond}} \quad (4.3)$$

où Cw est la valeur de contraste de Weber obtenue à partir des valeurs : L_{zone1} , la luminance de la zone d'intérêt et L_{fond} celle du fond de l'image.

Les profils d'intensité (partie E de la figure 4.1) montrent le contraste obtenu dans chaque cas. Qualitativement, avec la *phase plate*, on constate que le contraste est plus marqué que sans *phase plate*, avec ou sans filtre oméga. Lorsque l'on combine la *phase plate* et le filtre, le contraste est voisin de celui obtenu avec la *phase plate*.

Quantitativement, en l'absence de *phase plate* les valeurs de contraste de Weber sont de 0.17 et 0.16 pour l'acquisition de référence et celle utilisant le filtre oméga respectivement. Cependant, dans le cas où la *phase plate* est utilisée, le profil des objets est plus net. On constate une augmentation du contraste de Weber avec des valeurs de 1.07 et 0.89 pour les objets avec utilisation de la *phase plate* seule et de la *phase plate* combinée au filtre oméga respectivement.

En conclusion, la *phase plate* permet une augmentation significative du contraste lors d'une acquisition TEM, et sa combinaison avec un filtre à perte d'énergie apporte encore une amélioration des images. Cette augmentation de contraste s'accompagne d'une réduction du bruit de fond associée à une meilleure cohérence énergétique du faisceau d'électrons.

En tenant compte des résultats précédents, nous avons appliqué cette combinaison de *phase plate* et filtre oméga à un échantillon biologique (bactériophage T5) cryo-congelé que nous avons observé en cryo-TEM à une dose de $10e/\text{Å}^2$.

La figure 4.4 met en évidence le gain de contraste obtenu grâce à l'utilisation de la *phase plate* (HFPP), combinée ou non avec le filtre oméga, qui permet l'observation des queues de bactériophages, autrement non détectables à la focale en utilisant le filtre oméga seul (figure 4.4 A). Ceci confirme les résultats obtenus sur l'échantillon de test (Au grating grid) (figure 4.1).

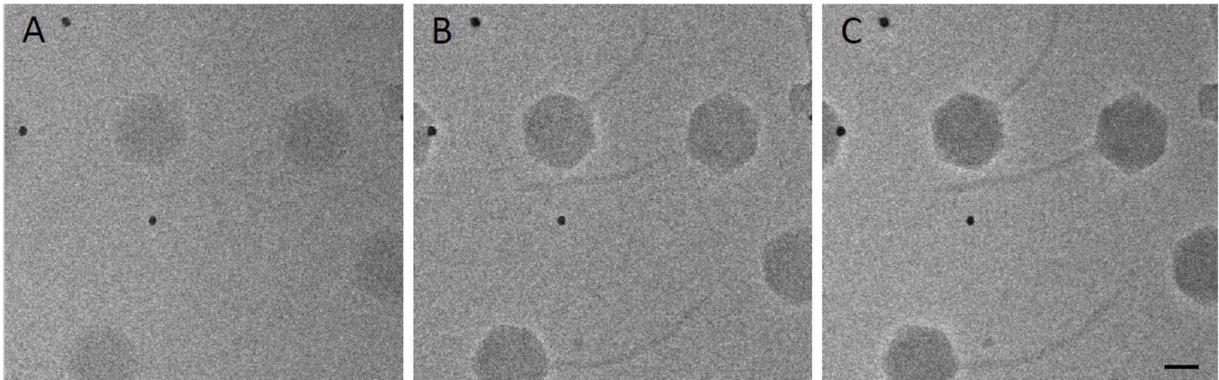


FIGURE 4.4 – Comparaison entre 3 acquisitions cryo-TEM de bactériophage T5 : avec le filtre oméga seul (A), avec la *phase plate* seule (B) et une combinaison *phase plate* et filtre oméga (C). L'amélioration apportée par l'utilisation de la *phase plate* est mise en évidence par l'observation des queues des bactériophages. La barre d'échelle correspond à 50nm.

4.2 La défocalisation, une autre méthode pour exploiter le contraste de phase

Comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, il est aussi possible d'améliorer le contraste en utilisant la défocalisation avec des reconstructions numériques de la phase. Nous avons abordé ces questions en développant une approche simplifiée, que nous avons publiée dans l'article en annexe C. Un aspect important du travail a été la réalisation d'un plugin pour ImageJ qui permet d'appliquer cette méthode simplifiée et de la diffuser à un large public.

Article associé en annexe (Annexe C)

An ImageJ tool for Simplified post-treatment of TEM Phase Contrast Images (SPCI)

Verguet Amandine, Messaoudi Cédric, Marco Sergio et Donnadiou Patricia.

Publié le 28 mars 2019

Parue dans la revue *Micron* <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.01.006>

Plugin SPCI <http://www.cmib.fr/fr/telechargements/software/SPCI.html>

Sources <https://github.com/averguet/spci.git>

4.2.1 Problématique

Comme expliqué dans l'introduction, le contraste des images de phase dépend de la défocalisation. En défocalisant, on peut augmenter ou diminuer ce contraste. Il est classique de défocaliser fortement une image pour augmenter le contraste, ce qui engendre une déformation mais aussi une modification des contours de l'objet. L'image en contraste de phase ne montre pas l'objet lui-même pour deux raisons. Tout d'abord, une image correspond à une intensité donc au module au carré d'une amplitude, l'effet de la lentille objectif s'exprime relativement simplement sur une amplitude à travers la fonction de transfert du microscope, il n'en est pas de même sur une intensité car l'information de phase est perdue. Ensuite, la CTF agit comme un filtre des fréquences spatiales et selon la défocalisation de la lentille objectif, les détails à certaines fréquences peuvent être atténués voir disparaître. Sur le principe, en utilisant un très grand nombre d'images défocalisées, on peut reconstruire une image de phase fidèle à l'objet.

Différentes approches de très haute résolution ont été développées notamment par C. Koch, elles sont basées sur des séries focales à grand nombre de termes et complétées par des simulations (Koch, 2014). Il s'agit de méthodes faisant appel à des algorithmes de reconstruction sophistiqués et permettant d'atteindre des résolutions de l'ordre de l'angström. Toutefois, si on ne cherche pas une reconstruction à très haute résolution, la perte d'information correspondant aux hautes fréquences spatiales n'est pas gênante. Pour des objets dont la taille est supérieure à la dizaine de nanomètres, on peut développer une méthode simplifiée utilisant un minimum d'images défocalisées.

Une méthode simplifiée a été proposée par (Donnadiou et al., 2008) qui permet de reconstruire l'image de phase à une résolution nanométrique à partir de 3 images défocalisées. Cette méthode a été validée sur des particules d'or. Lors de l'European Microscopy Congress (Lyon, 2016), nous avons établi une collaboration ayant pour but d'appliquer cette méthode à des objets biologiques et de développer un outil logiciel sous la forme d'un plugin pour *ImageJ*. Ce plugin permet d'extraire une image de phase par un traitement numérique simple appliqué à deux ou trois images défocalisées, acquises avec un microscope standard.

4.2.2 Approche expérimentale

La méthode étant détaillée dans l'article (Donnadieu et al., 2008), elle ne sera que brièvement rappelée ci-dessous.

A la base du travail qui va suivre se trouve l'expression de la fonction de transfert sur laquelle on a appliqué des simplifications (4.4). La CTF s'exprime comme suit :

$$T(q, \Delta z) = \exp(-i\chi(q)) = \exp(i(-(\frac{\pi C_s \lambda^3}{2} q^4 + \pi \lambda \Delta z q^2))) \quad (4.4)$$

où λ est la longueur d'onde des électrons, Δz la valeur de défocalisation de la lentille objectif, C_s est le coefficient d'aberration sphérique de la lentille objectif et q correspond à la distance dans le réseau réciproque.

Pour deux images acquises à des valeurs de défocus différentes $-\Delta$ et $+\Delta$, en négligeant l'effet des aberrations et en se limitant à une résolution nanométrique, on obtient pour l'image de phase la relation approchée suivante :

$$\hat{\Phi}(q) = -\frac{1}{I_0} \frac{1}{2\pi\lambda q^2} \frac{\Delta_0 \hat{I}(q)}{\Delta z} \quad (4.5)$$

Cette relation (4.5) présente une divergence quand $q = 0$. Cette singularité peut être éliminée en appliquant un outil mathématique : la régularisation de Tikhonov (Tikhonov, 1963). Cette régularisation introduira un paramètre ajustable (que l'on nommera a-value) dans le calcul de l'image de phase. Quand le paramètre de Tikhonov a une valeur minimale, l'image de phase peut être quantitative. Les autres paramètres, étant liés aux paramètres d'acquisition du microscope, sont donc connus par l'utilisateur.

Il est de plus possible d'utiliser cette approche avec une seule image défocalisée. Dans ce cas, l'image de phase reconstruite ne peut pas être quantitative mais elle permet de mieux visualiser les détails en ajustant le paramètre a-value. Cette application qualitative peut présenter un intérêt pour les échantillons produisant des images à faible contraste en TEM.

4.2.3 Résultats

Le développement du plugin est réalisé à partir de l'équation d'origine basée sur l'utilisation de 3 images focales : 2 images symétriquement défocalisées autour d'une image au focus, par exemple : -83nm, 0nm et +83nm.

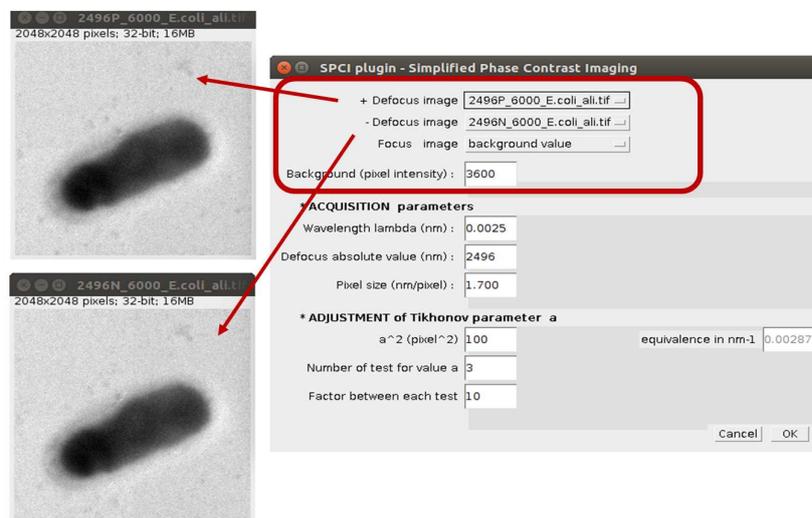


FIGURE 4.5 – Présentation de l'interface utilisateur du plugin SPCI en utilisant deux images en entrée. Le cadre rouge correspond aux entrées des images (cas à 2 et 3 images).

Le plugin a été conçu afin d’exploiter tout type d’images (8bit, 16 bit et 32 bit) et de faire la distinction entre les paramètres expérimentaux et le paramètre ajustable a -value qui est exprimé à la fois en nm^{-1} et en pixel pour une meilleure compréhension de l’utilisation. Le plugin permet de calculer l’image de phase pour un ensemble de paramètres choisis par l’utilisateur afin d’en visualiser rapidement les effets, lui permettant ainsi de sélectionner l’image de phase la plus pertinente selon le système étudié.

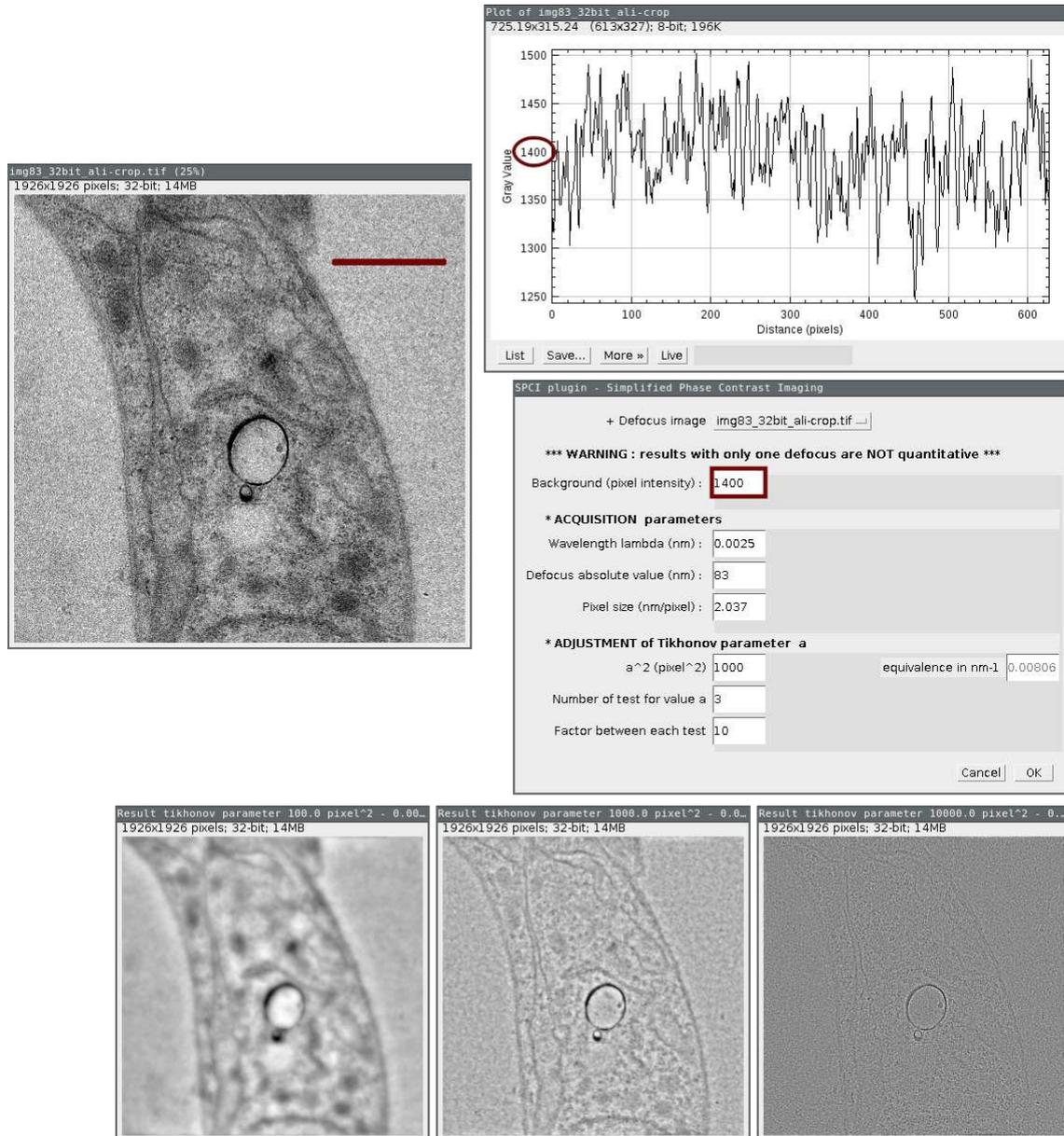


FIGURE 4.6 – Capture d’écran de l’interface utilisateur présentant une image à traiter, le profil du fond de l’image, l’interface du plugin et les résultats obtenus. Le profil sert à déterminer la valeur moyenne du fond de l’image (1400) afin de paramétrer le plugin.

Durant les tests de validation, la possibilité de n’utiliser que 2 images défocalisées a été ajoutée après avoir constaté que l’image au focus pouvait être remplacée par une image constante correspondant à la valeur de fond de l’image déterminée par l’utilisateur. Cette approche a été évaluée de manière quantitative sur des billes d’or dans la section 4.2.1.1 de l’article (Verguet et al., 2019) proposé en annexe.

Le plugin a été appliqué à des images acquises à partir des échantillons biologiques (*Trypanosoma brucei* et *Escherichia coli*) pour lesquelles on a obtenu des images de phase qui se sont

avérées assez bruitées lorsque la défocalisation n'était pas importante. Au cours de ces tests, on a mis en évidence l'utilisation d'une seule image défocalisée qui, couplée à une valeur de fond, permet d'améliorer le contraste.

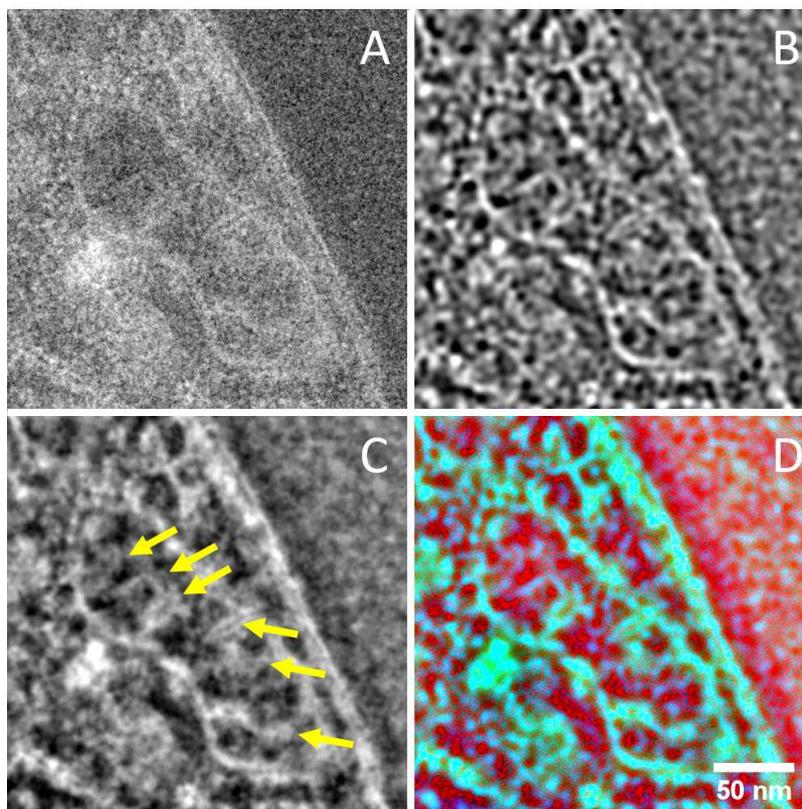


FIGURE 4.7 – Comparaison du traitement SPCI à une image seule avec le filtre passe-bande pour l'identification des crêtes mitochondriales. (A) Image brute défocalisée à +83 nm. (B) Image d'application d'un filtre passe-bande. (C) Image de phase résultant d'un traitement SPCI d'une seule image (a-valeur 0,012 nm⁻¹). Identification des crêtes mitochondriale par des flèches jaunes. (D) Superposition des images précédentes : image brute (canal rouge), image filtrée passe-bande (canal bleu) et une image de phase reconstruite avec SPCI (canal vert). Des petits points rouges sont présents sur toutes les images, ils correspondent à du bruit de haute fréquence. Ces points sont éliminés après l'application des deux traitements (passe-bande et SPCI une image). Cependant, il convient de noter que le filtre passe-bande est associé à des artefacts représentés par le bleu qui sont absents de l'image verte de traitement une image SPCI. La barre d'échelle est de 50 nm.

Pour mieux évaluer l'intérêt d'un traitement SPCI d'une seule image, il a été comparé (dans l'article (Verguet et al., 2019), annexe C) avec le filtre passe-bande de Fourier qui est largement utilisé. La figure 4.7 est un montage d'images acquises en TEM d'une section de la bactérie *E. coli* inclus en résine (époxy). On identifie sur la figure 4.7 (A) la mitochondrie, mais le faible contraste et le bruit ne permettent pas de distinguer clairement la crête mitochondriale. Un filtre passe-bande de Fourier permet d'améliorer les contours de la mitochondrie comme le montre la figure 4.7 (B). Le traitement SPCI à une image donne une image de phase (figure 4.7 C) où les bords des mitochondries sont bien préservés. Les principales densités présentes dans la mitochondrie peuvent ainsi être interprétées de manière précise (flèches jaunes sur la figure 4.7).

Cet exemple illustre les différences entre le filtre passe-bande et l'application du traitement SPCI à une image. Cela s'explique par le fait que le filtre passe-bande transmet uniformément les fréquences à l'intérieur de l'intervalle défini par les basses et hautes fréquences, alors que le traitement SPCI à une image est basé sur une simplification de la CTF. Le traitement SPCI à une image permet également une meilleure segmentation comme l'illustre l'image couleur de la 4.7 (D). Il limite également les artefacts de bord souvent associés à l'application du filtre passe-bande, tout en permettant une augmentation du contraste du bord de l'objet.

4.3 Conclusion et Perspectives

Dans ce chapitre, deux méthodes permettant d'améliorer le contraste des images ont été mises en oeuvre et évaluées :

- sur un échantillon test pour la *phase plate* et
- sur des échantillons biologiques pour l'approche simplifiée avec le plugin SPCI.

Il a ainsi été montré que la *phase plate* combinée avec un filtre en énergie, permet une augmentation du rapport signal sur bruit. L'approche simplifiée avec le plugin SPCI a été poussée dans sa simplification vers un traitement qualitatif à partir d'une seule image. Ce traitement comparé à un filtre passe-bande s'avère particulièrement efficace pour des observations de détails en vu de segmentations. Le développement et l'application du plugin SPCI sont présentés en détails dans l'article en annexe C.

Chapitre 5

Développements informatiques pour l'acquisition aléatoire de données parcimonieuses en STEM

5.1 Problématique

Comme évoqué précédemment, la dose reçue par les échantillons biologiques sensibles est une contrainte forte en microscopie électronique en transmission. En diminuant la dose d'électrons, on observe une réduction des dommages causés à l'échantillon, hélas accompagnée d'une baisse du rapport signal sur bruit (SNR) de l'image. Afin d'améliorer cette situation, il est utile de s'assurer que l'on bénéficie des dernières technologies disponibles en terme de capteur d'image. Un changement du mode d'acquisition, en favorisant le STEM, peut aussi limiter les effets de dose (Wolf et al., 2014). Une approche plus récente, encore en étude dans le domaine de la biologie, est l'acquisition aléatoire de données partielles d'une image. Cette méthode d'acquisition a pour but de limiter la dose en réalisant l'acquisition d'un nombre limité et aléatoire de points de l'échantillon. Dans cette approche, le faisceau d'électrons balaie une surface restreinte mais non locale de l'échantillon. En microscopie électronique en transmission, le STEM est le seul mode permettant ce type d'acquisition. Cette méthode sera ici définie sous le terme *Random-Beam STEM* (RB-STEM).

En théorie, ce type d'acquisition permettrait de réaliser des tomogrammes sur des échantillons fragiles tels que les échantillons biologiques hydratés-congelés, connus pour être sensibles aux électrons. Des tests sont actuellement réalisés dans notre laboratoire pour mettre en place le RB-STEM. Ces acquisitions sont à l'heure actuelle encore limitées par les contraintes liées à l'instrument.

Outre ces problématiques instrumentales, ce type d'approche novatrice apporte avec elle de nombreuses questions quant à sa mise en place et son utilisation : Comment acquiert-on des images en RB-STEM? Comment réaliser leur reconstruction et leur alignement? Est-ce que les algorithmes d'alignement classiques sont efficaces?

5.2 Approche expérimentale

Pour pouvoir concevoir un outil approprié aux acquisitions parcimonieuses, il est nécessaire d'étudier les méthodes permettant leur acquisition. Actuellement, il est possible de réaliser des modifications matérielles sur le microscope TEM pour implémenter des coupures du faisceau d'électrons lors d'une acquisition. Il est aussi possible d'utiliser, dans une certaine mesure, les logiciels de pilotages du microscope pour obtenir un résultat approchant.

5.2.1 Acquisition parcimonieuse

En théorie, l'acquisition d'une image parcimonieuse de façon totalement aléatoire demande l'accès au mécanisme de coupure (*blanking*) du faisceau d'électrons du microscope. Un montage expérimental a été proposé utilisant un obturateur *ou blander* de faisceau électromagnétique placé au niveau du condenseur d'un microscope STEM (Béché et al., 2016). Aucun procédé n'est pour l'instant disponible pour notre microscope. N'ayant pas les compétences en interne ni la possibilité d'effectuer des modifications intrusives sur notre instrument, nous avons favorisé l'exploration d'approches logicielles. Au sein de notre laboratoire S.Trépout a développé et utilisé des scripts *Digital Micrograph* afin de piloter le balayage aléatoire de l'échantillon selon des critères prédéfinis que nous évoquerons.

5.2.2 Restauration des images parcimonieuses

Les séries tomographiques ainsi acquises, où chaque image ne contient qu'une partie de l'information totale, nécessite un processus particulier de restauration. Une classe d'algorithmes est dédiée à la réalisation d'opérations d'*Inpainting*. Ces derniers tentent par différentes méthodes de proposer des valeurs réalistes pour les échantillons manquants.

Généralités sur l'inpainting

Dans une image issue d'une acquisition parcimonieuse, les valeurs des pixels manquants doivent être déduites des pixels ayant des valeurs déterminées.

L'idée générale de l'*inpainting* est de faire des hypothèses sur les propriétés mathématiques propres aux images que l'on cherche à restaurer et d'être capable de proposer un algorithme qui estime les valeurs des pixels manquants en respectant ces hypothèses.

Certaines hypothèses sont applicables à tout type d'image du monde réel, tandis que d'autres seront plus adaptées à une certaine classe d'images, telles que celles acquises en microscopie électronique, par exemple. De même, le choix de l'algorithme le plus adapté peut dépendre de la répartition des pixels manquants dans l'image.

Une hypothèse simple serait de considérer que chaque pixel indéterminé possède une probabilité forte d'avoir une valeur proche de celles des pixels voisins déterminés. Dans ce cas, on peut proposer un algorithme qui calcule les pixels manquants à partir d'une moyenne des valeurs voisines, pondérées par les distances aux pixels. Un tel algorithme fait apparaître des dégradés dans les triangles dont les sommets sont des pixels déterminés. Il en résulte une diffusion des valeurs des pixels déterminés vers les pixels indéterminés. Cette approche est simpliste car l'hypothèse de départ ignore certaines informations supplémentaires qui pourraient être extraites des pixels présents initialement, telles que les gradients dans l'image, les contours, entre autres.

Certains algorithmes d'*inpainting* fonctionnent par itérations successives, partant d'une image comportant une première estimation des valeurs manquantes. Ils appliquent ensuite une transformation mathématique qui corrige l'image obtenue pour la rapprocher d'une image qui satisfait aux hypothèses choisies. Les valeurs déterminées sont ensuite replacées à leur valeurs initiales dans l'image et le processus peut recommencer avec une nouvelle itération.

Différentes sous-classes d'algorithmes existent, qui sont basées sur différents principes :

- La préservation des bords peut-être réalisée en minimisant la diffusion des valeurs des pixels lorsqu'une forte variation est détectée. L'approche *Variational Image Inpainting* utilise des équations différentielles partielles (PDE) pour prendre en compte l'orientation des bords contrastés dans l'image (Chan and Shen, 2005)
- Lorsqu'un nombre important des pixels contigus n'ont pas de valeurs déterminées, l'approche précédente n'est pas suffisante pour préserver les bords dans l'image. L'utilisation de PDE d'ordre plus élevé permet de prolonger les bords dans la zone à restaurer et ainsi de résoudre ce problème (Burger et al., 2009).

- Le *compressed sensing* fait l'hypothèse que toutes les images d'intérêt possèdent une redondance d'information qui est exploitable pour la reconstruction. Bien que d'intérêt dans le domaine de la microscopie, son principe est relativement complexe à appréhender, c'est pourquoi la section suivante lui est dédiée.
- Certaines méthodes proposent la reconstruction de texture dans les zones manquantes. D'autres encore, basées sur le *deep-learning* sont capables de dessiner des objets complexes pour compléter une scène. On dépasse ici la limite des hypothèses qui sont acceptables pour restaurer une image exploitable en science.

Il faut garder à l'esprit que les algorithmes d'*inpainting* sont aussi conçus et utilisés lorsque seul l'aspect esthétique des images compte. Les données reconstruites peuvent alors être éloignées de la réalité de l'échantillon ou même être complètement fantaisistes. Il convient donc de ne pas choisir aveuglément un algorithme et de bien comprendre comment les données extrapolées sont générées, pour savoir quelles études peuvent être menées et quelles conclusions l'image restaurée nous permet d'obtenir.

Compressed sensing

Certains algorithmes d'*inpainting* performants sont basés sur le *compressed sensing*. Avant d'expliquer ce qu'est le *compressed sensing* et comment il permet d'estimer des données manquantes dans une image, nous allons évoquer les principes sous-jacents que sont la compression de données et l'échantillonnage de données compressées.

Si on exclu les signaux composés purement de bruit blanc, c'est à dire les images composées de pixels aléatoires, qui sont de très loin les plus répandus parmi l'ensemble des images possibles, il reste les images représentant le monde réel. Le principe du *compressed sensing* soutient l'idée que les signaux obtenus dans le monde réel, contrairement au bruit blanc, possèdent une certaine structure et contiennent donc une redondance d'information.

Cette structure dans les signaux est mise en évidence par le fait qu'ils peuvent être compressés, c'est à dire être exprimés sous une forme (aussi appelée base) qui fait apparaître un grand nombre de valeurs identiques, typiquement de zéros. Si on prend l'exemple d'une image ou d'un son, l'application de la transformée de Fourier fera par exemple apparaître un nombre important de valeurs nulles ou quasi nulles dans le spectre, bien que ce ne soit pas le cas dans la forme originale des données. Si l'on doit stocker cette image ou ce son, il suffit d'omettre toutes les valeurs nulles du spectre pour obtenir une version compressée et compacte des données de départ. C'est précisément sur ce principe que sont basés les formats de fichier informatiques JPEG pour les images et MP3 pour les sons, entre autres. Bien que souvent utilisée, la transformée de Fourier n'est ici qu'un exemple, toute autre base permettant d'exprimer les données de départ en faisant apparaître une certaine redondance est valable pour réaliser la compression.

L'approche du *compressed sensing* suggère que lorsque l'on a affaire à des données compressibles par nature, effectuer l'acquisition du signal directement dans sa représentation compressée serait plus économique qu'un échantillonnage direct. Dans le cas d'une mélodie jouée sur un piano, par analogie, on pourrait envisager de faire l'acquisition directement des fréquences sur le spectre plutôt que d'échantillonner le signal sonore que l'on compresserait ensuite. Pour ce faire, on pourrait collecter les notes jouées par le musicien, dont chacune possède une fréquence sonore distincte. En première approche, le reste du spectre déduit de la note serait nulle. L'absence de quelques harmoniques ferait toutefois défaut, et il faudrait prendre soin de déduire ces fréquences secondaire de la fréquence fondamentale, pour rendre correctement la sonorité spécifique à l'instrument. C'est ici que la connaissance préalable de la nature des données nous permettrait d'imposer des contraintes spécifiques sur le spectre pour reconstruire le signal complet à partir de données compressées initialement incomplètes.

Dans les faits, il n'est pas possible de procéder directement à l'échantillonnage de données compressées avec un capteur d'image. Il est cependant possible d'exprimer mathématiquement une forme compressée incomplète d'une image à partir des valeurs d'un sous-ensemble de ses

pixels. Pour cela, le *compressed sensing* s'appuie sur plusieurs outils mathématiques et propose un mécanisme d'estimation des données compressées manquantes. Appliqué à des images, il permet d'estimer la valeur de pixels qui n'ont pas été échantillonnés. La représentation incomplète de la forme compressée de l'image se traduit par un système d'équations sous-déterminé (Candès et al., 2006; Donoho, 2006). Sa résolution, qui semble à priori impossible, permettrait d'accéder à l'image compressée complète et donc de décompresser l'image vers sa forme originale. Toutefois, en partant de l'hypothèse que la représentation compressée d'une image du monde réel devrait contenir, à priori, un maximum de valeur à zéro, il est possible de favoriser une solution parmi toutes les solutions possibles à ce système. En utilisant un algorithme de minimisation, on est capable en effet, de trouver une telle solution qui propose un maximum de variables nulles. Ceci nous permet alors de trouver une solution qui satisfait l'hypothèse de départ sur la nature creuse du spectre des images du monde réel, et ainsi de reconstruire une image sous échantillonnée avec une bonne probabilité de s'approcher de la réalité.

5.3 Génération des données parcimonieuses

5.3.1 Simulations d'acquisitions

En raison de la complexité d'un pilotage spécifique de l'obturateur et des limitations du module logiciel *Digiscan* (dans *Digital Micrograph* de *Gatan*) pour la réalisation d'acquisitions parcimonieuses, nous avons eu recours à la simulation pour générer des images correspondant aux différents cas d'acquisition. Ceci nous a permis de déterminer quelle approche est la plus pertinente pour les traitements d'images nécessaires à la reconstruction tomographique. Une option de simulation a été intégrée à TomoJ (Messaoudi et al., 2007) qui propose les cas présentés dans la figure 5.1.

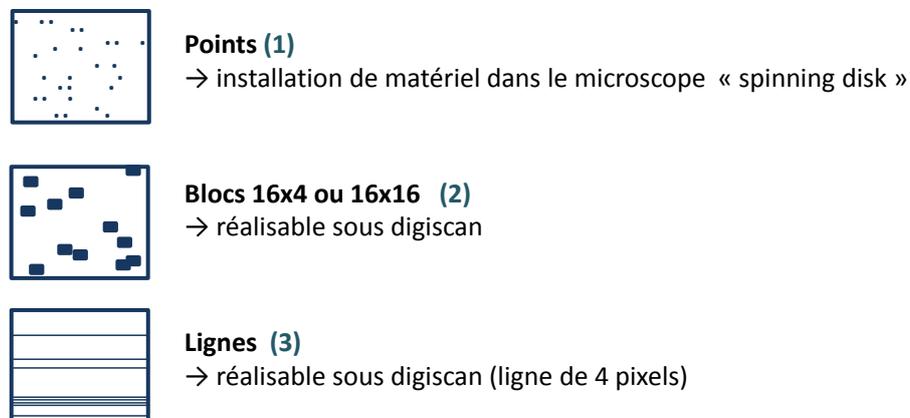


FIGURE 5.1 – Différentes possibilités d'acquisition parcimonieuse : par point (1) acquisition théorique optimale, par blocs (2) acquisition réalisable avec *Digiscan* sous la forme de blocs 16×4 ou 16×16 (2) et par lignes (3).

Le cas (1) de la figure 5.1 se rapproche le plus des images comprenant des pixels aux valeurs déterminées idéalement repartis pour l'utilisation d'un algorithme de *Compressed sensing*. Cette répartition est cependant impossible à obtenir avec notre instrument, à l'inverse des blocs tels que présentés en (2) (figure 5.1). Les blocs de 16×4 correspondent au format le plus petit qu'il est possible d'obtenir en utilisant *Digiscan*. C'est actuellement cette méthode que l'on utilise dans notre équipe pour les acquisitions parcimonieuses. Nous avons également testé les blocs de 16×16 pour étudier l'effet de l'augmentation de la taille des blocs sur les algorithmes. Le cas (3) de la figure 5.1 a été également simulé, selon le souhait d'un constructeur de développer un détecteur STEM proposant une acquisition par balayage entrelacé. Ceci permettrait ainsi d'envisager des lignes d'une épaisseur de 1 pixel, sachant que dans les scripts actuels, l'épaisseur minimale d'une ligne est de 4 pixels.

L'intérêt de la simulation est double. Elle permet d'estimer la part minimal de points (blocs ou lignes), ayant une valeur déterminées, nécessaires pour obtenir une reconstruction optimale de l'image. Elle permet également d'étudier l'influence de leur répartition dans l'image.

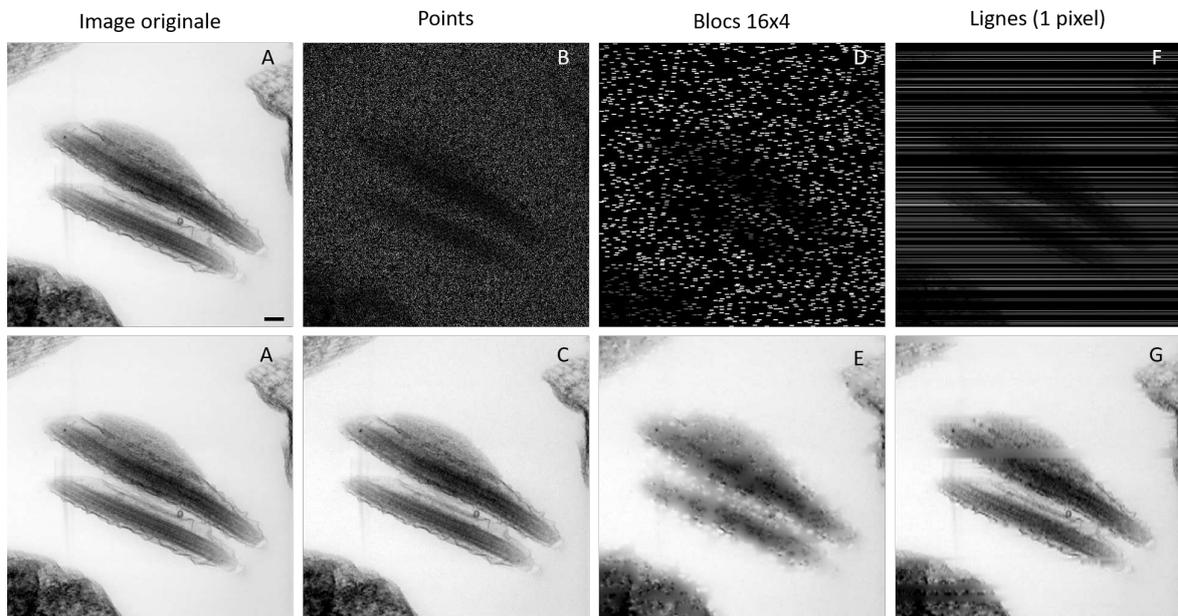


FIGURE 5.2 – Simulation de différents motifs d'acquisition parcimonieuse sur un échantillon de *Trypanosoma brucei* acquis en STEM. L'image A correspond à l'angle -50° de la série d'inclinaisons réalisée en image complète. Les images B, D et F sont obtenues en simulant une acquisition parcimonieuse à partir de l'image A selon différentes méthodes d'acquisitions. Simulation d'une acquisition théorique par points (B), simulation d'une acquisition par blocs de 16×4 réalisable expérimentalement (D), simulation d'une acquisition théorique par lignes d'un pixel de hauteur (F). Pour chacune de ces acquisitions, la restauration de l'image a été réalisée par *inpainting* : images C, E et G. La barre d'échelle correspond à 250 nm.

5.3.2 Résultat de restauration

Afin de déterminer la qualité de la restauration par *inpainting* pour chaque motif d'acquisition parcimonieuse, nous avons choisi d'utiliser le coefficient de corrélation et le coefficient d'erreur quadratique moyen entre les images restaurées et l'image originale (graphique 5.3 et 5.4). L'algorithme d'*inpainting* utilisé est une implémentation de la méthode de Garcia (Garcia, 2010). Même s'il ne qualifie pas son algorithme comme étant du *compressed sensing*, elle en présente toutefois certains traits.

Des simulations ont été réalisées pour chaque méthode de parcimonie précédemment citée (points, blocs, lignes) avec une proportion d'information présente variant entre 1% et 50%, par pas de 1%. La figure 5.2 présente des images parcimonieuses restaurées utilisant 10% des pixels présents initialement. Visuellement, on constate que l'approche par points permet d'obtenir un résultat proche de l'image d'origine. Pour l'évaluer de manière quantitative, nous avons utilisé la corrélation croisée entre l'image restaurée et l'image originale. Avec 10% des points, les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0.95 pour toutes les valeurs, cependant trois groupes se détachent : la méthode par points possède un coefficient de corrélation proche de 1, les méthodes par blocs de 16×4 et par lignes de 1 pixel avoisinent 0.98. Les méthodes par blocs de 16×16 et par lignes de 4 pixels sont à 0.95. Ceci est confirmé par les valeurs obtenues pour les erreurs quadratiques moyennes (graphique 5.4).

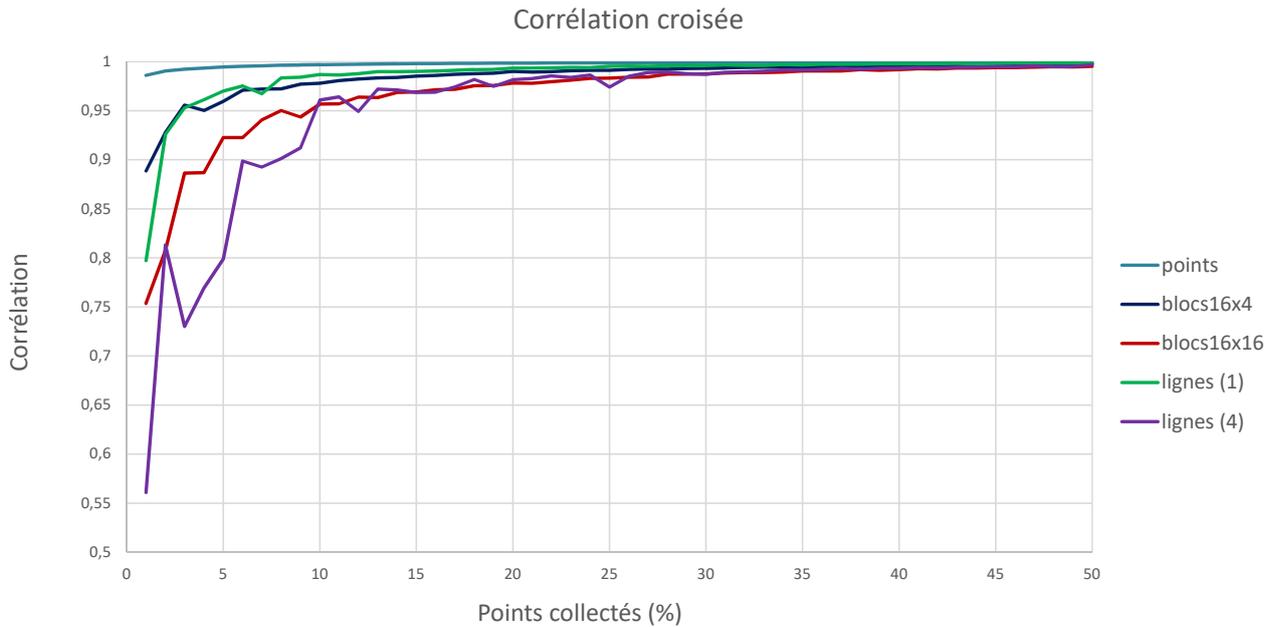


FIGURE 5.3 – Estimation du coefficient de corrélation pour chaque proportion de points collectés entre l'image parcimonieuse restaurée et l'image originale complète. L'image originale est l'image à -50° provenant de la série d'inclinaisons acquise en STEM sur un échantillon de *Trypanosoma brucei*. Pour chaque type d'acquisition (par points, blocs de 16×16 et blocs de 16×4 , lignes d'une épaisseur de 1 et 4 pixels) des calculs de corrélation ont été réalisés sur une gamme de points collectés allant de 1% à 50% de l'image complète.

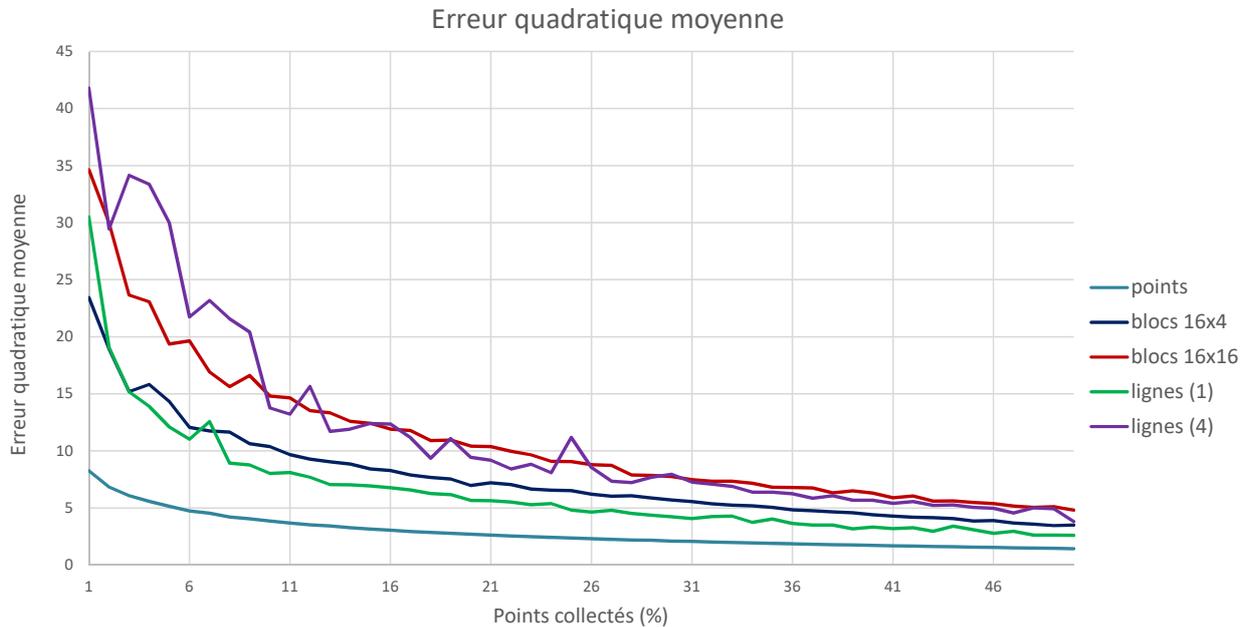


FIGURE 5.4 – Estimation de l'erreur quadratique moyenne pour chaque proportion de points collectés entre l'image parcimonieuse restaurée et l'image originale complète. Les mêmes remarques que pour la figure 5.3 s'appliquent.

5.4 Reconstruction multi-échelle

Nous avons élaboré et implémenté un algorithme de reconstruction multi-échelle (MS-SIRT), où les premières itérations sont réalisées sur des images de taille réduite et servent par la suite de conditions initiales pour des reconstructions plus grandes. En effet les conditions initiales, habituellement utilisées par l'algorithme SIRT tel que décrit dans le chapitre d'introduction, sont

simplistes. Ceci nous a paru être une opportunité d'amélioration de l'algorithme d'origine. Après avoir décrit notre algorithme en détail, nous aborderons les questions relatives aux performances de ce nouvel algorithme. Les questions qui me paraissent pertinentes et auxquelles je vais tenter de répondre sont :

- Dans quelle mesure la qualité des images peut-elle être améliorée?
- Dans quelle mesure le temps de calcul peut-il être réduit?
- Quel est l'intérêt de cet algorithme dans le cas d'acquisitions parcimonieuses?
- Doit-on l'utiliser conjointement avec un algorithme d'*inpainting*?

5.4.1 Description de MS-SIRT

L'algorithme proposé est composé de 4 étapes principales représentées dans la figure 5.5 qui s'enchaînent comme suit :

- (1) multiples réductions de la taille de la série d'inclinaisons d'un facteur 2 (n fois),
- (2) reconstruction de la série la plus réduite avec SIRT,
- (3) agrandissement de la reconstruction d'un facteur 2,
- (4) reconstruction SIRT à partir de la série d'inclinaisons $n - 1$ et de la reconstruction agrandie n ,
- (5) répétition des étapes (3) et (4) jusqu'à reconstruire la série d'inclinaisons à sa taille d'origine.

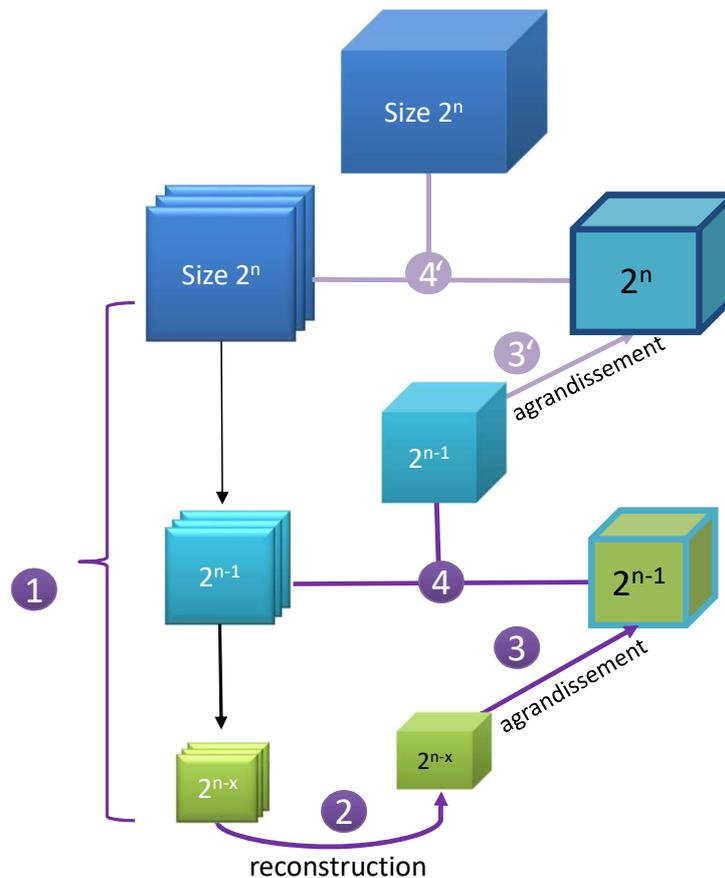


FIGURE 5.5 – MS-SIRT, les étapes de l'algorithme.

Réduction de taille

Comme évoqué précédemment, les images de la série sont réduites plusieurs fois par un facteur deux. Lorsque ces images sont issues d'une acquisition parcimonieuse, l'étape de réduction de taille est particulière. En effet, lors d'une réduction de la taille par deux, un groupe de 4 pixels permet habituellement de calculer un unique pixel sur l'image réduite. Dans notre cas, lorsqu'aucun des 4 pixels n'a de valeur déterminée, le pixel résultant après réduction reste indéterminé. Dans les trois autres cas, il est possible d'obtenir une estimation en calculant la moyenne des pixels déterminés parmi les 4.

Ainsi, à chaque réduction, la densité de pixels ayant une valeur indéterminée diminue. On peut démontrer que lorsque la répartition aléatoire des pixels indéterminés est suffisamment uniforme initialement, il ne reste que des pixels avec des valeurs déterminées à partir d'une certaine échelle de réduction.

Reconstruction

L'algorithme SIRT se satisfait normalement d'une estimation simpliste du volume reconstruit lors de la première itération. Dans cette estimation, tous les pixels d'une section du volume possèdent la même valeur. Il utilise ensuite les images de la série pour faire converger les valeurs des pixels du volume 3D vers la reconstruction finale, et ce lors de plusieurs itérations.

Lors de l'étape (4) dans notre approche, l'algorithme SIRT part de la reconstruction obtenue à l'échelle inférieure plutôt qu'une estimation simpliste. Pour ce faire, nous procédons à un agrandissement de la reconstruction de taille inférieure.

Agrandissement

En première approche, j'ai utilisé la méthode d'agrandissement des plus proches voisins (*Nearest Neighbor*) pour réaliser un agrandissement de la reconstruction. Bien que l'algorithme soit ainsi fonctionnel, il en résulte un effet d'*aliasing* sur le résultat. J'utilise à présent une interpolation bilinéaire, mais la situation n'est pas encore parfaite à cet égard. Ceci se manifeste sur les images reconstruites par un léger effet de pixellisation, qui en dégrade la qualité.

Une méthode d'agrandissement basée sur des interpolations cubiques (Zhou et al., 2012) est envisagée en remplacement de la précédente méthode. J'ai étudié et implémenté la version 2D de cet algorithme. Cependant, en raison du manque de temps, je n'ai pas encore finalisé son implémentation en 3D nécessaire à l'intégration dans MS-SIRT.

5.4.2 Evaluation

Méthode

La métrique habituelle qui consiste à estimer la qualité de la reconstruction en fonction du nombre d'itérations ne peut pas être utilisée avec MS-SIRT, l'approche multi-échelle apportant des degrés de liberté additionnels dans le paramétrage de l'algorithme. En effet, il convient tout d'abord de choisir combien de facteurs d'échelle doivent être mis en oeuvre, puis pour chacune de ces étapes, choisir le nombre d'itérations à réaliser.

Qu'elle soit théorique, c'est à dire basée sur la complexité, ou mesurée en pratique, la question des performances d'exécution de MS-SIRT doit donc se poser en terme de temps de calcul global plutôt qu'en nombre d'itérations, pour un niveau de qualité de reconstruction donné.

Bien que l'importante latitude de paramétrage de MS-SIRT incite à la réalisation de nombreux essais dans le but d'évaluer ses performances, les possibilités sont limitées. En effet, l'état actuel des performances proposées par les machines exécutant les implémentations de SIRT et MS-SIRT limite le nombre d'essais qu'il est possible de réaliser dans un temps fini. Ainsi sur ma station de travail Intel Xeon 8 coeurs, sans utilisation du GPU, TomoJ (Messaoudi et al., 2007) exécute une seule reconstruction de 30 itérations sur une série d'images de 512×512 en plus d'une heure.

Performances

Nous avons donc choisi d'évaluer le nombre d'itérations de SIRT nécessaires à approcher la qualité de reconstruction de MS-SIRT paramétré de manière fixe. Nous effectuons pour cela une reconstruction avec MS-SIRT sur une série d'images de 512×512 pixels, avec 10 itérations à l'échelle 1/4 (128×128), 10 itérations à l'échelle 1/2 (256×256) et enfin 10 itérations à l'échelle 1.

Nécessité de l'inpainting

Généralement, les méthodes d'*inpainting* sont utilisées pour restaurer les images de série d'inclinaisons acquises de manière aléatoire et parcimonieuse, avant d'être injectées dans un processus classique d'alignement et de reconstruction tomographique. Dans cette approche, la restauration des données manquantes dues à l'acquisition parcimonieuse s'effectue donc indépendamment sur chaque image de la série, avant le processus de restauration. Il est toutefois concevable que les informations de plusieurs images issues d'acquisitions parcimonieuses soient mises en commun pendant le processus de reconstruction, sans étape préalable d'*inpainting*. Ainsi, les rayons sont projetés uniquement par des pixels déterminés, issus des images de la série. Dans cette approche le fait que de multiples rayons se recoupent permet d'extraire une information suffisante à la reconstruction de chaque point du volume 3D.

Les essais montrent cependant qu'avec un processus de reconstruction standard de type SIRT, le manque d'information dans les images ne permet pas d'atteindre la qualité des reconstructions ayant préalablement recours à l'*inpainting*.

Lorsque des images parcimonieuses sont utilisées directement avec MS-SIRT, des reconstructions de petites tailles de bonne qualité sont plus faciles à obtenir car le nombre de pixels manquants diminue avec la taille des images. Ceci permet d'augmenter la qualité du résultat.

Résultats

L'exécution des 3×10 itérations de MS-SIRT paramétré tel que décrit précédemment s'effectue en 25 minutes et sert de référence en terme de qualité de reconstruction.

Lors des essais réalisés, il apparaît qu'une étape préalable d'*inpainting* n'améliore pas le résultat entre deux exécutions de MS-SIRT (figure 5.6, les images A et B sont similaires).

Il apparaît également que 15 itérations de SIRT directement appliquées sur des données parcimonieuses ne permettent pas tout à fait d'obtenir la qualité de MS-SIRT, bien que s'exécutant en 36 minutes. (figure 5.6, image C).

Lorsque l'*inpainting* entre en jeu pour SIRT, la qualité s'améliore significativement et la version actuelle de MS-SIRT n'est plus compétitive. La perception des détails les plus fins est entravée par l'effet de pixellisation attribuée à l'étape d'agrandissement encore perfectible de MS-SIRT. Ceci est mis en évidence par une qualité légèrement supérieure du résultat avec 10 itérations de SIRT, ce qui est équivalent aux nombres d'itérations de pleine taille de MS-SIRT. Mon interprétation de ce résultat est que les conditions initiales introduites par MS-SIRT, bien que globalement bénéfiques, sont problématiques dans les hautes fréquences, pour la raison évoquée.

En terme de temps de calcul, l'algorithme SIRT ayant une complexité en temps de $O(n^4)$ (Bicer et al., 2017), une seule itération sur des images de pleine taille nécessite le même temps de calcul qu'un nombre non négligeable d'itérations sur des images de tailles inférieures. Autrement dit, pour que MS-SIRT soit d'intérêt, il suffit qu'une amélioration des conditions initiales permette d'accroître la qualité finale avec le même impact que seulement quelques itérations de pleine taille.

Par ailleurs, il faut noter qu'un nombre important d'itérations sur des images de pleine taille réduit forcément l'impact des conditions initiales et tend à réduire l'avantage de MS-SIRT par rapport à SIRT.

Ces résultats sont amenés à évoluer avec l'incorporation d'un algorithme d'agrandissement de meilleure qualité dans MS-SIRT.

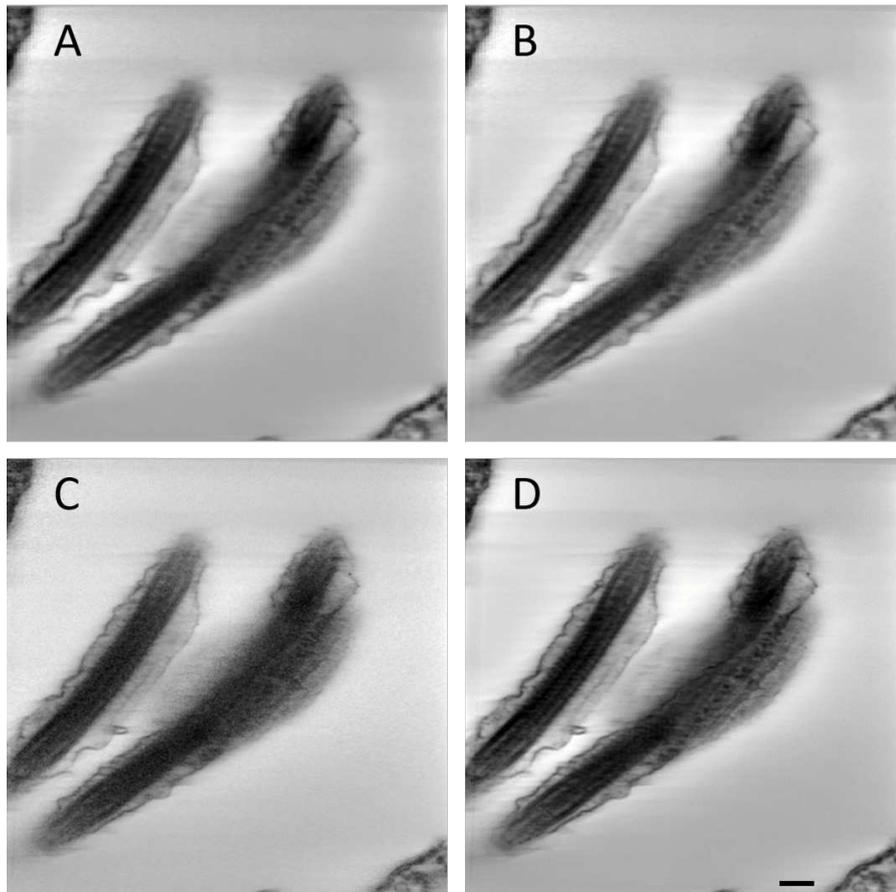


FIGURE 5.6 – Plans XY de reconstructions réalisées sur une série d’inclinaisons après simulation parcimonieuse et suite à une restauration par inpainting. L’échantillon utilisé est *Trypanosoma brucei* acquis en STEM BF. La série d’inclinaisons contient les données complètes sur lesquelles ont été réalisées une simulation de parcimonie de 40% des points présents (reconstructions A et C). Cette même série a été utilisée pour réaliser une restauration des données par *inpainting* (reconstruction B et D). Chaque série a ensuite été reconstruite avec l’algorithme MS-SIRT (images A et B, après 30 itérations cumulées dont 10 itérations à une taille maximale) et en utilisant SIRT (images C et D, après 15 itérations). La barre d’échelle correspond à 200nm.

5.5 Reconstruction multi-échelle avec alignement intégré

L’algorithme MS-SIRT présenté précédemment utilise des images préalablement alignées.

Nous proposons ici de le faire évoluer vers un algorithme que l’on a nommé SAR (*Simultaneous Alignment and Reconstruction*). Pour sa conception, nous avons étudié la possibilité d’intégration du processus d’alignement à la reconstruction des séries tomographiques parcimonieuses.

Combiner l’alignement des images et leur reconstruction a pour but d’affiner les résultats entre chaque reconstruction. Afin de réaliser les premiers essais, une implémentation utilisant la méthode d’alignement par corrélation croisée globale a été couplée à une reconstruction itérative de type SIRT. Le déroulement de l’algorithme proposé est présenté dans la figure 5.7.

L'algorithme proposé est composé de 4 étapes principales représentées dans la figure 5.7 qui s'enchaînent comme suit :

- (1) multiples réductions de la taille de la série d'inclinaisons d'un facteur 2 (n fois),
- (2) alignement et reconstruction de la série la plus réduite avec SIRT,
- (3) agrandissement de la reconstruction d'un facteur 2,
- (4) reconstruction SIRT à partir de la série d'inclinaisons $n - 1$ et de la reconstruction agrandie n , cette étape inclue un alignement permettant d'affiner le résultat provenant de la reconstruction,
- (5) répétition des étapes (3) et (4) jusqu'à reconstruire la série d'inclinaisons à sa taille d'origine.

La mise en oeuvre est fonctionnelle et a permis de réaliser la reconstruction de séries contenant des images ayant volontairement subi une translation. Il a été possible de constater un réalignement correspondant aux translations introduites.

Aucun test de performance n'a pu être effectué pour l'instant sur ce travail en cours. Il conviendrait d'intégrer des algorithmes d'alignement plus avancés tel que ceux présentés dans le chapitre 3 avant d'étudier le gain de temps éventuel que procurerait l'approche SAR.

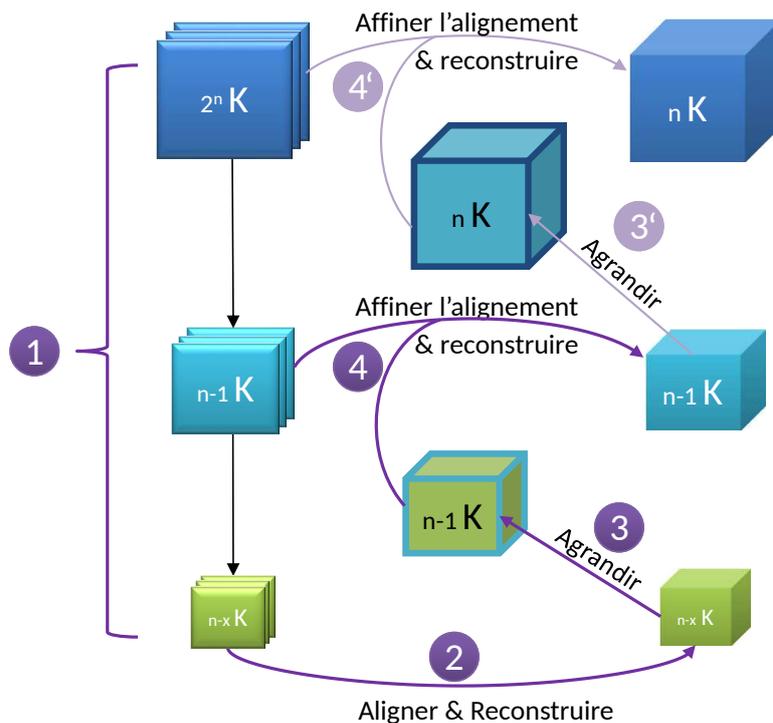


FIGURE 5.7 – SAR est composé des principales étapes de MS-SIRT avec une étape en plus qui est l'alignement des données provenant de la reconstruction précédente.

5.6 Conclusion

L'acquisition parcimonieuse est nécessaire pour obtenir les tomogrammes de certains échantillons sensibles à la dose d'électrons. L'exploitation de ces données nécessite des algorithmes capables d'extraire le maximum d'informations à partir de la série d'inclinaisons.

Dans ce chapitre nous avons évoqué les algorithmes permettant la restauration des données manquantes dans les séries ainsi que le comportement de l'algorithme de reconstruction SIRT en présence de données incomplètes ou restaurées. Deux algorithmes de reconstruction basés sur l'approche multi-échelle ont été proposés. Ils sont le sujet d'un travail de recherche qui donne ses premiers résultats mais qu'il reste à finaliser.

Dans le cas de MS-SIRT, ses performances sont d'ores et déjà avantageuses lorsqu'aucune procédure de restauration n'est utilisée. D'autres développements et essais sont nécessaires et seront menés en dehors du cadre de cette thèse.

Quant à SAR, il est encore trop tôt pour en venter les mérites, mais il ouvre encore d'autres perspectives de recherches et bénéficiera des avancées réalisées sur MS-SIRT.

Chapitre 6

Conclusion générale et Perspectives

Dans le domaine de la microscopie électronique à transmission, l'optimisation et l'amélioration globale des images nécessite d'appréhender aussi bien les théories physiques permettant d'expliquer le fonctionnement de l'instrument que les concepts algorithmiques permettant d'en traiter les images. Il existe pour chaque limitation et contrainte des systèmes actuels un axe de recherche proposant ou esquissant une solution instrumentale, informatique ou liant intimement les deux domaines. Quant aux échantillons observés, la chimie et la biologie ne sont pas en reste, puisqu'elles ont besoin d'outils d'analyse performants pour évoluer, motivant ainsi le développement de nouvelles techniques instrumentales.

Les travaux que j'ai effectués au cours de cette thèse et présentés dans ce manuscrit montrent plusieurs axes d'amélioration des techniques actuelles utilisées pour acquérir et traiter les images en microscopie électronique en transmission. Les recherches effectuées permettent d'appréhender les limites et contraintes rencontrées dans la mise en oeuvre de ces techniques, mais aussi d'évaluer la pertinence de certaines solutions disponibles pour les surmonter. Par ailleurs, je contribue à l'amélioration des techniques en proposant de nouveaux outils algorithmiques ainsi que leur réalisation informatique.

Dans le chapitre 2, j'ai réalisé la caractérisation des paramètres d'acquisition du microscope JEM-220FS utilisé pour les essais de combinaison du filtre d'énergie (Oméga) et du mode d'acquisition STEM. Je montre que la combinaison des deux méthodes amène à une amélioration des images des échantillons biologiques inclus dans une résine époxy ou hydratés et congelés. L'amélioration obtenue est mise en évidence par l'augmentation du rapport signal sur bruit des images. Le décalage de la fente lors de l'inclinaison de l'échantillon reste cependant un facteur limitant de la technique EF-STEM. J'estime que cette technique reste néanmoins prometteuse même si des développements spécifiques sont nécessaires pour surmonter cette limitation instrumentale.

Dans le chapitre 3, je m'intéresse aux algorithmes permettant l'alignement d'images des séries tomographiques. Plusieurs approches manuelles ou automatiques existent pour aligner ces images, chacune se décomposant en plusieurs étapes. J'évalue ici l'approche récente qui consiste à utiliser des algorithmes de détection de points caractéristiques et d'alignement automatique basés sur des descripteurs. Ces multiples algorithmes étant principalement développés en dehors du domaine de la microscopie, j'en évalue la pertinence pour notre usage. Bien que tous donnent des alignements satisfaisants, il s'avère que les algorithmes évalués diffèrent par leur rapidité, leur tolérance aux images bruitées et leur complexité de paramétrage pour l'utilisateur. Selon les essais que j'ai pu mener, je suggère l'utilisation des algorithmes AKAZE et KAZE pour l'alignement des images destinées à une reconstruction tomographique. En 2018, j'ai pu décrire l'utilisation de SIFT en tomographie dans le chapitre *Alignment of tilt series* (Verguet et al., 2018) du livre *Cellular Imaging* (Hanssen, 2018). De plus, l'étude comparative des algorithmes d'alignement présentée ici fait l'objet d'un article en cours de soumission.

Dans le chapitre 4, j'évalue la pertinence et la complexité de mise en oeuvre de deux techniques permettant l'amélioration des images basées sur le contraste de phase. La première tech-

nique nécessite l'installation d'un nouveau composant sur l'instrument : la *phase plate*. La seconde technique, qui est purement logicielle, est implémentée dans un plugin de ma conception, pour le logiciel ImageJ, que je distribue librement. Il a été montré que la *phase plate* combinée avec un filtre d'énergie permet une augmentation du rapport signal sur bruit. Par ailleurs, j'ai montré que l'approche logicielle qui nécessite normalement l'acquisition d'un minimum de 3 images défocalisées, peut donner des résultats qualitatifs avec une seule. Ces résultats ont pu être publiés dans l'article *An ImageJ tool for simplified post-treatment of TEM phase contrast images (SPCI)* (Verguet et al., 2019).

Dans le chapitre 5, j'étudie différentes approches et algorithmes permettant la reconstruction tomographique à partir de données parcimonieuses. Ces approches sont essentielles pour l'acquisition de séries lorsque l'échantillon est sensible à la dose d'électrons. Ainsi, je propose deux nouveaux algorithmes de reconstruction encore en cours d'élaboration, basées sur une approche multi-échelle.

Enfin, les méthodes d'acquisitions EF-TEM et STEM utilisées pour la cartographie chimique, ainsi que les méthodes d'alignement pour les reconstructions tomographiques, bénéficieront des développements présentés au cours de cette thèse dans les chapitres 2, 3 et 5. Ces travaux fondés sur les concepts les plus récents pourront servir de base à des travaux futurs pour l'optimisation et le développement de la cartographie chimique tridimensionnelle en biologie.

Bibliographie

- Abdel-Hakim A. E. and Farag A. A. *CSIFT : A SIFT Descriptor with Color Invariant Characteristics*, volume 2. IEEE, Jun 2006. doi : 10.1109/CVPR.2006.95. [Cited on page 26.]
- Alahi Alexandre, Ortiz Raphael, and Vanderghenst Pierre. FREAK : Fast Retina Keypoint. *2012 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pages 510–517, Jun 2012. ISSN 1063-6919. doi : 10.1109/CVPR.2012.6247715. [Cited on page 26.]
- Alcantarilla Pablo, Bartoli Adrien, and Davison Andrew J. KAZE Features. *SpringerLink*, pages 214–227, Oct 2012. doi : 10.1007/978-3-642-33783-3_16. [Cited on pages 26, 40, and 41.]
- Alcantarilla Pablo, Nuevo Jesus, and Bartoli Adrien. Fast explicit diffusion for accelerated features in nonlinear scale spaces. In *Proceedings of the British Machine Vision Conference*. BMVA Press, 2013. [Cited on pages 26, 40, 41, and 43.]
- Andersen A. H. and Kak A. C. Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique (SART) : A superior implementation of the ART algorithm. *Ultrasonic Imaging*, 6(1) :81–94, Jan 1984. ISSN 0161-7346. doi : 10.1016/0161-7346(84)90008-7. [Cited on pages 20 and 42.]
- Batenburg Kees Joost and Sijbers Jan. DART : A Practical Reconstruction Algorithm for Discrete Tomography. *IEEE Trans. Image Process.*, 20(9) :2542–2553, Mar 2011. ISSN 1057-7149. doi : 10.1109/TIP.2011.2131661. [Cited on page 20.]
- Bay Herbert, Ess Andreas, Tuytelaars Tinne, and Van Gool Luc. Speeded-Up Robust Features (SURF). *Comput. Vision Image Understanding*, 110(3) :346–359, Jun 2008. ISSN 1077-3142. doi : 10.1016/j.cviu.2007.09.014. [Cited on pages 26, 40, and 41.]
- Béché A., Goris B., Freitag B., and Verbeeck J. Development of a fast electromagnetic beam blanker for compressed sensing in scanning transmission electron microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 108(9) : 093103, Feb 2016. ISSN 0003-6951. doi : 10.1063/1.4943086. [Cited on page 60.]
- Beis J. S. and Lowe D. G. *Shape indexing using approximate nearest-neighbour search in high-dimensional spaces*. IEEE, Jun 1997. doi : 10.1109/CVPR.1997.609451. [Cited on pages 25 and 42.]
- Bicer Tekin, Gürsoy Doğa, De Andrade Vincent, Kettimuthu Rajkumar, Scullin William, De Carlo Francesco, and Foster Ian T. Trace : a high-throughput tomographic reconstruction engine for large-scale datasets. *Adv. Struct. Chem. Imag.*, 3(1) :1–10, Dec 2017. ISSN 2198-0926. doi : 10.1186/s40679-017-0040-7. [Cited on page 67.]
- Bradski G. The OpenCV Library. *Dr. Dobb's Journal of Software Tools*, 2000. [Cited on page 41.]
- Brown and Lowe. *Recognising panoramas*. IEEE, Oct 2003. ISBN 978-0-7695-1950-0. doi : 10.1109/ICCV.2003.1238630. [Cited on page 26.]
- Brown Matthew and Lowe David G. Automatic Panoramic Image Stitching using Invariant Features. *Int. J. Comput. Vision*, 74(1) :59–73, Aug 2007. ISSN 1573-1405. doi : 10.1007/s11263-006-0002-3. [Cited on page 26.]

- Buban James P., Ramasse Quentin, Gipson Bryant, Browning Nigel D., and Stahlberg Henning. High-resolution low-dose scanning transmission electron microscopy. *J. Electron Microsc.*, 59 (2) :103–112, Nov 2009. ISSN 2050-5698. doi : 10.1093/jmicro/dfp052. [Cited on page 29.]
- Burger Martin, He Lin, and Schönlieb Carola-Bibiane. Cahn-Hilliard Inpainting and a Generalization for Grayvalue Images. *SIAM J. Imag. Sci.*, 2(4) :1129–1167, Jan 2009. ISSN 1936-4954. doi : 10.1137/080728548. [Cited on page 60.]
- Candès Emmanuel J., Romberg Justin K., and Tao Terence. Stable signal recovery from incomplete and inaccurate measurements. *Commun. Pure Appl. Math.*, 59(8) :1207–1223, Aug 2006. ISSN 0010-3640. doi : 10.1002/cpa.20124. [Cited on page 62.]
- Castaño-Díez Daniel, Scheffer Margot, Al-Amoudi Ashraf, and Frangakis Achilleas S. Alignator : A GPU powered software package for robust fiducial-less alignment of cryo tilt-series. *J. Struct. Biol.*, 170(1) :117–126, Apr 2010. ISSN 1047-8477. doi : 10.1016/j.jsb.2010.01.014. [Cited on page 39.]
- Chan Tony F. and Shen Jianhong (Jackie). Variational image inpainting. *Commun. Pure Appl. Math.*, 58(5) :579–619, May 2005. ISSN 0010-3640. doi : 10.1002/cpa.20075. [Cited on page 60.]
- Chen Delei, Goris Bart, Bleichrodt Folkert, Mezerji Hamed Heidari, Bals Sara, Batenburg Kees Joost, de With Gijbertus, and Friedrich Heiner. The properties of SIRT, TVM, and DART for 3D imaging of tubular domains in nanocomposite thin-films and sections. *Ultramicroscopy*, 147 :137–148, Dec 2014. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2014.08.005. [Cited on page 20.]
- Colliex Christian, Kociak Mathieu, and Stéphan Odile. Electron Energy Loss Spectroscopy imaging of surface plasmons at the nanometer scale. *Ultramicroscopy*, 162 :A1–A24, Mar 2016. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2015.11.012. [Cited on page 12.]
- Crewe A. V. and Wall J. A scanning microscope with 5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 48(3) :375–393, Mar 1970. ISSN 0022-2836. doi : 10.1016/0022-2836(70)90052-5. [Cited on page 3.]
- Da Cunha Marcel Menezes Lyra, Trepout Sylvain, Messaoudi Cédric, Wu Ting-Di, Ortega Richard, Guerquin-Kern Jean-Luc, and Marco Sergio. Overview of chemical imaging methods to address biological questions. *Micron*, 84 :23–36, May 2016. ISSN 0968-4328. doi : 10.1016/j.micron.2016.02.005. [Cited on page 1.]
- Danev Radostin and Nagayama Kuniaki. Transmission electron microscopy with Zernike phase plate. *Ultramicroscopy*, 88(4) :243–252, Sep 2001. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/S0304-3991(01)00088-2. [Cited on page 11.]
- Danev Radostin and Nagayama Kuniaki. Optimizing the phase shift and the cut-on periodicity of phase plates for TEM. *Ultramicroscopy*, 111(8) :1305–1315, Jul 2011. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2011.04.004. [Cited on page 10.]
- Danev Radostin, Glaeser Robert M., and Nagayama Kuniaki. Practical factors affecting the performance of a thin-film phase plate for transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 109 (4) :312–325, Mar 2009. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2008.12.006. [Cited on page 11.]
- Danev Radostin, Buijsse Bart, Khoshouei Maryam, Plitzko Jürgen M., and Baumeister Wolfgang. Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111(44) :15635–15640, Nov 2014. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.1418377111. [Cited on page 11.]

- Donnadieu P., Lazar S., Botton G. A., Pignot-Paintrand I., Reynolds M., and Perez S. Seeing structures and measuring properties with transmission electron microscopy images : A simple combination to study size effects in nanoparticle systems. *Appl. Phys. Lett.*, 94(26) : ISI :000267697300053, 2008. doi : 10.1063/1.3168525. [Cited on pages 54 and 55.]
- Donoho D.L. Compressed sensing. *IEEE Transactions on Information Theory*, 52, 2006. doi : 10.1109/tit.2006.871582. URL <http://gen.lib.rus.ec/scimag/index.php?s=10.1109/tit.2006.871582>. [Cited on page 62.]
- Dubochet J. and Lepault J. CRYO-ELECTRON MICROSCOPY OF VITRIFIED WATER. *J. Phys. Colloques*, 45(C7) :C7-85-C7-94, Sep 1984. ISSN 0449-1947. doi : 10.1051/jphyscol:1984709. [Cited on page 5.]
- Dubochet Jacques, Adrian Marc, Chang Jiin-Ju, Homo Jean-Claude, Lepault Jean, McDowall Alasdair W., and Schultz Patrick. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.*, 21(2) :129-228, May 1988. ISSN 1469-8994. doi : 10.1017/S0033583500004297. [Cited on pages 13 and 15.]
- Edgcombe C. J., Ionescu A., Loudon J. C., Blackburn A. M., Kurebayashi H., and Barnes C. H. W. Characterisation of ferromagnetic rings for Zernike phase plates using the Aharonov-Bohm effect. *Ultramicroscopy*, 120 :78-85, Sep 2012. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2012.06.011. [Cited on page 11.]
- Egerton R. F., Li P., and Malac M. Radiation damage in the TEM and SEM. *Micron*, 35(6) :399-409, Aug 2004. ISSN 0968-4328. doi : 10.1016/j.micron.2004.02.003. [Cited on page 15.]
- Fischler Martin A. and Bolles Robert C. Random sample consensus : a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Commun. ACM*, 24(6) :381-395, Jun 1981. ISSN 0001-0782. doi : 10.1145/358669.358692. [Cited on pages 25 and 42.]
- Frindt Nicole, Oster Marco, Hettler Simon, Gamm Björn, Dieterle Levin, Kowalsky Wolfgang, Gerthsen Dagmar, and Schröder Rasmus R. In-Focus Electrostatic Zach Phase Plate Imaging for Transmission Electron Microscopy with Tunable Phase Contrast of Frozen Hydrated Biological Samples. *Microsc. Microanal.*, 20(1) :175-183, Feb 2014. ISSN 1431-9276. doi : 10.1017/S1431927613013901. [Cited on page 11.]
- Garcia Damien. Robust smoothing of gridded data in one and higher dimensions with missing values. *Computational Statistics & Data Analysis*, 54(4) :1167-1178, Apr 2010. ISSN 0167-9473. doi : 10.1016/j.csda.2009.09.020. [Cited on page 63.]
- Gilbert Peter. Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections. *J. Theor. Biol.*, 36(1) :105-117, Jul 1972. ISSN 0022-5193. doi : 10.1016/0022-5193(72)90180-4. [Cited on page 20.]
- Gordon Iryna and Lowe David G. What and Where : 3D Object Recognition with Accurate Pose. *SpringerLink*, pages 67-82, 2006. doi : 10.1007/11957959_4. [Cited on page 26.]
- Gordon Richard, Bender Robert, and Herman Gabor T. Algebraic Reconstruction Techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and X-ray photography. *J. Theor. Biol.*, 29(3) : 471-481, Dec 1970. ISSN 0022-5193. doi : 10.1016/0022-5193(70)90109-8. [Cited on page 20.]
- Guay Matthew D., Czaja Wojciech, Aronova Maria A., and Leapman Richard D. Compressed Sensing Electron Tomography for Determining Biological Structure. *Sci. Rep.*, 6 :27614, Jun 2016. ISSN 2045-2322. doi : 10.1038/srep27614. [Cited on page 20.]
- Han Renmin, Zhang Fa, Wan Xiaohua, Fernández Jose-Jesus, Sun Fei, and Liu Zhiyong. A marker-free automatic alignment method based on scale-invariant features. *J. Struct. Biol.*, 186(1) :

- 167–180, Apr 2014. ISSN 1047-8477. doi : 10.1016/j.jsb.2014.02.011. [Cited on pages 23, 26, and 40.]
- Hanssen Eric. *Cellular Imaging*. Springer, Cham, 2018. ISBN 978-3-319-68995-1. doi : 10.1007/978-3-319-68997-5. [Cited on page 71.]
- Ishikawa Takashi. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 9(1) : a028076, Jan 2017. doi : 10.1101/cshperspect.a028076. [Cited on page 29.]
- Işık Şahin. A Comparative Evaluation of Well-known Feature Detectors and Descriptors. *International Journal of Applied Mathematics Electronics and Computers*, 3(1) :1–6, Jan 2015. doi : 10.18100/ijamec.60004. [Cited on page 26.]
- JEOL. Measuring probe convergent angle in stem mode and take off angle in haadf, 2003. [Cited on page 32.]
- Kapinchev Konstantin, Bradu Adrian, Barnes Frederick, and Podoleanu Adrian. GPU implementation of cross-correlation for image generation in real time. *2015 9th International Conference on Signal Processing and Communication Systems (ICSPCS)*, pages 1–6, Dec 2015. doi : 10.1109/ICSPCS.2015.7391783. [Cited on page 21.]
- Ke Yan and Sukthankar R. *PCA-SIFT : a more distinctive representation for local image descriptors*, volume 2. IEEE, Jun 2004. doi : 10.1109/CVPR.2004.1315206. [Cited on page 26.]
- Kim Min Woo, Choi Jiyoung, Yu Liu, Lee Kyung Eun, Han Sung-Sik, and Ye Jong Chul. Cryo-electron microscopy single particle reconstruction of virus particles using compressed sensing theory. *Computational Imaging V*, 6498 :64981G, Feb 2007. doi : 10.1117/12.705008. [Cited on page 20.]
- Koch Christoph T. Towards full-resolution inline electron holography. *Micron*, 63 :69–75, Aug 2014. ISSN 0968-4328. doi : 10.1016/j.micron.2013.10.009. [Cited on page 54.]
- Lambert L. and Mulvey T. Ernst Ruska (1906–1988), Designer Extraordinaire of the Electron Microscope : A Memoir. *Advances in Imaging and Electron Physics*, 95 :2–62, Jan 1996. ISSN 1076-5670. doi : 10.1016/S1076-5670(08)70155-1. [Cited on page 3.]
- Laptev Ivan and Lindeberg Tony. Local Descriptors for Spatio-temporal Recognition. *SpringerLink*, pages 91–103, May 2004. doi : 10.1007/11676959_8. [Cited on page 26.]
- Leary Rowan, Saghi Zineb, Midgley Paul A., and Holland Daniel J. Compressed sensing electron tomography. *Ultramicroscopy*, 131 :70–91, Aug 2013. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2013.03.019. [Cited on page 20.]
- Leutenegger Stefan, Chli Margarita, and Siegwart Roland Y. BRISK : Binary Robust invariant scalable keypoints. *2011 International Conference on Computer Vision*, pages 2548–2555, Nov 2011. ISSN 2380-7504. doi : 10.1109/ICCV.2011.6126542. [Cited on pages 40 and 41.]
- Lodha Suresh K. and Xiao Yongqin. GSIFT : geometric scale invariant feature transform for terrain data. *Vision Geometry XIV*, 6066 :60660L, Jan 2006. doi : 10.1117/12.650890. [Cited on page 26.]
- Lowe David G. Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *Int. J. Comput. Vision*, 60(2) :91–110, Nov 2004. ISSN 1573-1405. doi : 10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94. [Cited on pages 23, 25, 40, 41, and 42.]
- Marko Michael, Hsieh Chyongere, Leith Eric, Mastronarde David, and Motoki Sohei. Practical Experience with Hole-Free Phase Plates for Cryo Electron Microscopy. *Microsc. Microanal.*, 22 (6) :1316–1328, Dec 2016. ISSN 1431-9276. doi : 10.1017/S143192761601196X. [Cited on page 11.]

- Martin Yannick. *Development of electron microscopy diffraction techniques for the study of two and three dimensional materials*. PhD thesis, Université de Grenoble, Oct 2014. URL <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01442648>. [Cited on page 32.]
- Mastronarde David N. Fiducial Marker and Hybrid Alignment Methods for Single- and Double-axis Tomography. *SpringerLink*, pages 163–185, 2007. doi : 10.1007/978-0-387-69008-7_6. [Cited on page 22.]
- Matas J., Chum O., Urban M., and Pajdla T. Robust wide-baseline stereo from maximally stable extremal regions. *Image Vision Comput.*, 22(10) :761–767, Sep 2004. ISSN 0262-8856. doi : 10.1016/j.imavis.2004.02.006. [Cited on page 26.]
- Matsumoto Takao and Tonomura Akira. The phase constancy of electron waves traveling through Boersch's electrostatic phase plate. *Ultramicroscopy*, 63(1) :5–10, Apr 1996. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/0304-3991(96)00033-2. [Cited on page 11.]
- Messaoudi Cédric, Boudier Thomas, Sorzano Carlos Oscar Sanchez, and Marco Sergio. TomoJ : tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. *BMC Bioinf.*, 8(1) :1–9, Dec 2007. ISSN 1471-2105. doi : 10.1186/1471-2105-8-288. [Cited on pages 42, 62, and 66.]
- Messaoudi Cédric, Aschman Nicolas, Cunha Marcel, Oikawa Tetsuo, Sorzano Carlos O. Sanchez, and Marco Sergio. Three-Dimensional Chemical Mapping by EFTEM-TomoJ Including Improvement of SNR by PCA and ART Reconstruction of Volume by Noise Suppression. *Microsc. Microanal.*, 19(6) :1669–1677, Dec 2013. ISSN 1431-9276. doi : 10.1017/S1431927613013317. [Cited on page 2.]
- Midgley P. A. and Weyland M. 3D electron microscopy in the physical sciences : the development of Z-contrast and EFTEM tomography. *Ultramicroscopy*, 96(3) :413–431, Sep 2003. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/S0304-3991(03)00105-0. [Cited on page 1.]
- Midgley P. A., Weyland M., Yates T. J. V., Arslan I., Dunin-Borkowski R. E., and Thomas J. M. Nanoscale scanning transmission electron tomography. *J. Microsc.*, 223(3) :185–190, Sep 2006. ISSN 0022-2720. doi : 10.1111/j.1365-2818.2006.01616.x. [Cited on page 2.]
- Morel Jean-Michel and Yu Guoshen. ASIFT : A New Framework for Fully Affine Invariant Image Comparison. *SIAM J. Imag. Sci.*, 2(2) :438–469, Apr 2009. ISSN 1936-4954. doi : 10.1137/080732730. [Cited on page 26.]
- Nagayama Kuniaki and Danev Radostin. Phase contrast electron microscopy : development of thin-film phase plates and biological applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, Mar 2008. URL <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.2268>. [Cited on page 11.]
- Pearson Chad G. and Winey Mark. Basal body assembly in ciliates : the power of numbers. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(5) :461, May 2009. doi : 10.1111/j.1600-0854.2009.00885.x. [Cited on page 33.]
- Pennycook Stephen J. and Nellist Peter D. *Scanning Transmission Electron Microscopy* | Springer-Link. Springer, New York, NY, 2011. ISBN 978-1-4419-7199-9. doi : 10.1007/978-1-4419-7200-2. [Cited on page 3.]
- Radon Johann. On the determination of functions from their integral values along certain manifolds. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 5(4) :170–176, Dec 1986. ISSN 0278-0062. doi : 10.1109/TMI.1986.4307775. [Cited on page 17.]

- Reimer Ludwig and Kohl Helmut. *Transmission Electron Microscopy - Physics of Image Formation* | Ludwig Reimer | Springer. Springer-Verlag New York, 2008. ISBN 978-0-387-40093-8. doi : 10.1007/978-0-387-34758-5. [Cited on page 3.]
- Rosten Edward and Drummond Tom. Machine Learning for High-Speed Corner Detection. *SpringerLink*, pages 430–443, May 2006. doi : 10.1007/11744023_34. [Cited on pages 26 and 41.]
- Rubleo Ethan, Rabaud Vincent, Konolige Kurt, and Bradski Gary. ORB : An efficient alternative to SIFT or SURF. *2011 International Conference on Computer Vision*, pages 2564–2571, Nov 2011. ISSN 2380-7504. doi : 10.1109/ICCV.2011.6126544. [Cited on pages 26, 40, and 41.]
- Scovanner Paul, Ali Saad, and Shah Mubarak. *A 3-dimensional sift descriptor and its application to action recognition*. ACM, Sep 2007. ISBN 978-1-59593-702-5. doi : 10.1145/1291233.1291311. [Cited on page 26.]
- Se S., Lowe D., and Little J. *Vision-based mobile robot localization and mapping using scale-invariant features*, volume 2. IEEE, May 2001. doi : 10.1109/ROBOT.2001.932909. [Cited on page 26.]
- Shannon C. E. Communication in the Presence of Noise. *Proc. IRE*, 37(1) :10–21, Jan 1949. ISSN 0096-8390. doi : 10.1109/JRPROC.1949.232969. [Cited on page 18.]
- Sorzano Carlos Oscar Sanchez, Messaoudi Cédric, Eibauer Matthias, Bilbao-Castro JR, Hegerl R., Nickell S., Marco S., and Carazo JM. Marker-free image registration of electron tomography tilt-series. *BMC Bioinf.*, 10(1) :124, Dec 2009. ISSN 1471-2105. doi : 10.1186/1471-2105-10-124. [Cited on pages 22, 39, and 42.]
- Sousa A. A., Hohmann-Marriott M. E., Zhang G., and Leapman R. D. Monte Carlo electron-trajectory simulations in bright-field and dark-field STEM : Implications for tomography of thick biological sections. *Ultramicroscopy*, 109(3) :213–221, Feb 2009. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2008.10.005. [Cited on pages 30 and 32.]
- Sternberg. Biomedical Image Processing. *Computer*, 16(1) :22–34, Jan 1983. doi : 10.1109/MC.1983.1654163. [Cited on page 36.]
- Tafti Ahmad P., Baghaie Ahmadreza, Kirkpatrick Andrew B., Holz Jessica D., Owen Heather A., D’Souza Roshan M., and Yu Zeyun. A comparative study on the application of SIFT, SURE, BRIEF and ORB for 3D surface reconstruction of electron microscopy images. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering : Imaging & Visualization*, 6(1) :17–30, Jan 2018. ISSN 2168-1163. doi : 10.1080/21681163.2016.1152201. [Cited on page 26.]
- Tareen S. A. K. and Saleem Z. A comparative analysis of SIFT, SURE, KAZE, AKAZE, ORB, and BRISK. *2018 International Conference on Computing, Mathematics and Engineering Technologies (iCOMET)*, pages 1–10, Mar 2018. doi : 10.1109/ICOMET.2018.8346440. [Cited on page 26.]
- Tassin Anne-Marie, Lemullois Michel, and Aubusson-Fleury Anne. Paramecium tetraurelia basal body structure. *Cilia*, 5(1) :1–6, Dec 2015. ISSN 2046-2530. doi : 10.1186/s13630-016-0026-4. [Cited on page 33.]
- Tikhonov A.N. Solution of Incorrectly Formulated Problems and the Regularization Method., Sep 1963. [Cited on page 55.]
- Trépout Sylvain, Tassin Anne-Marie, Marco Sergio, and Bastin Philippe. STEM tomography analysis of the trypanosome transition zone. *J. Struct. Biol.*, 202(1) :51–60, 2018. doi : 10.1016/j.jsb.2017.12.005. [Cited on page 43.]
- Verguet A., Messaoudi C., Sorzano C. O. S., and Marco S. Alignment of Tilt Series. *SpringerLink*, pages 183–207, 2018. doi : 10.1007/978-3-319-68997-5_7. [Cited on page 71.]

- Verguet Amandine, Messaoudi Cédric, Marco Sergio, and Donnadiou Patricia. An ImageJ tool for simplified post-treatment of TEM phase contrast images (SPCI). *Micron*, 121 :90–98, Jun 2019. ISSN 0968-4328. doi : 10.1016/j.micron.2019.01.006. [Cited on pages 56, 57, and 72.]
- von Ardenne Manfred. Das Elektronen-Rastermikroskop. *Z. Angew. Phys.*, 109(9-10) :553–572, Sep 1938. ISSN 0044-3328. doi : 10.1007/BF01341584. [Cited on page 3.]
- Wang Ge and Jiang Ming. Ordered-subset simultaneous algebraic reconstruction techniques (OS-SART). *J. X-Ray Sci. Technol.*, 12(3) :169–177, Jan 2004. ISSN 0895-3996. URL <https://content.iospress.com/articles/journal-of-x-ray-science-and-technology/xst00110>. [Cited on page 20.]
- Williams David B. and Carter C. Barry. *Transmission Electron Microscopy - A Textbook for Materials Science* | David B. Williams | Springer. Springer US, 2009. ISBN 978-0-387-76500-6. doi : 10.1007/978-0-387-76501-3. [Cited on page 3.]
- Winkler Hanspeter and Taylor Kenneth A. Accurate marker-free alignment with simultaneous geometry determination and reconstruction of tilt series in electron tomography. *Ultramicroscopy*, 106(3) :240–254, Feb 2006. ISSN 0304-3991. doi : 10.1016/j.ultramic.2005.07.007. [Cited on page 39.]
- Wolf Sharon Grayer, Houben Lothar, and Elbaum Michael. Cryo-scanning transmission electron tomography of vitrified cells. *Nat. Methods*, 11(4) :423, Feb 2014. ISSN 1548-7105. doi : 10.1038/nmeth.2842. [Cited on pages 29, 30, and 59.]
- Wu Jian, Cui Zhiming, Sheng Victor S., Zhao Pengpeng, Su Dongliang, and Gong Shengrong. A Comparative Study of SIFT and its Variants. *Measurement Science Review*, 13(3) :122–131, Jun 2013. doi : 10.2478/msr-2013-0021. [Cited on page 26.]
- Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7) :686–698, Jul 1942. ISSN 0031-8914. doi : 10.1016/S0031-8914(42)80035-X. [Cited on page 9.]
- Zhou D., Shen X., and Dong W. Image zooming using directional cubic convolution interpolation. *IET Image Proc.*, 6(6) :627–634, Oct 2012. ISSN 1751-9659. doi : 10.1049/iet-ipr.2011.0534. [Cited on page 66.]

Annexe A

Communications liées à la thèse

A.1 Publications

A.1.1 Livre

Cellular Imaging, Hanssen E. *Chapter : Alignment of Tilt Series*

Verguet Amandine, Messaoudi Cédric, Sorzano C.O.S and Marco Sergio.

Publié en janvier 2018, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering, Springer

DOI https://doi.org/10.1007/978-3-319-68997-5_7

Abstract

Computing of three-dimensional reconstructions from images obtained by transmission electron tomography needs three main steps : data acquisition, projection alignment, and 3D reconstruction. In this chapter we will focus on the process of alignment moving from the justification of its need to the study of the different classical approaches (cross-correlation, use of added fiducial markers) that have been commonly used in this alignment process. We will also discuss the most recent algorithms (multiscale registration, invariant feature recognition) as they have been adapted to Electron Tomography and improved to increase the accuracy and resolution of the final tomograms.

A.1.2 Articles

An ImageJ tool for simplified post-treatment of TEM phase contrast images (SPCI)

Verguet Amandine, Messaoudi Cédric, Marco Sergio and Donnadiou Patricia

Publié en juin 2019, *Micron*, volume 121, page 90-98

DOI <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.01.006>

Plugin SPCI <http://www.cmib.fr/fr/telechargements/software/SPCI.html>

Sources <https://github.com/averguet/spci.git>

Abstract Tools for taking advantage of phase-contrast in transmission electron microscopy are of great interest for both biological and material sciences studies as shown by the recent use of phase plates and the development of cryo-electron tomography. Nevertheless, these tools most often require highly qualified experts and access to advanced equipment that can only be considered after preliminary investigations. Here we propose to address this issue with the development of an ImageJ plugin that allow the retrieval of a phase image by simple numerical treatment applied to two defocused images. This treatment based on Tikhonov regularization requires the adjustment of a single parameter. Moreover, it is possible to use this approach on one-image. Although in that case the retrieved image gives only qualitative information, it is able to enhance the image contrast appropriately. This can be of interest for specimens producing low contrast images under the electron microscopes, such as some frozen hydrated biological samples or those sensitive to electron radiation unsuitable for ho-

lographic studies. Keywords : Image processing, Phase contraste, Phase image, TEM image, ImageJ plugin.

Comparison of methods based on feature tracking for fiducial-less image alignment in electron tomography

Verguet Amandine, Marco Sergio and Messaoudi Cédric

En révision depuis juillet 2019.

Abstract

Current studies in electron microscopy often rely on tomographic reconstruction to obtain 3D maps of a sample. During tilt-series acquisitions instrumental instabilities produces shifts between images, but reconstruction algorithms rely on correct geometric relationship between images. Thus, image alignment is mandatory to obtain accurate reconstructions. The current alignment methods start with a cross-correlation process, followed by a fiducial-markers or patch-based tracking phase. Since 2004, algorithms based on scale invariant feature transform (SIFT) expands in different fields like video de- tecton or image alignment. The use of SIFT has been proposed for images tilt-series alignment in electron tomography. Later, other alternatives to SIFT which can reduce computer time increasing accu- racy, have been published but not tested for electron tomography. Here we evaluate some of the feature tracking methods developed during the last decade and investigate their suitability for tomographic tilt- series alignment. We focus most particularly on approaches based on non-linear scale space (KAZE) or on binary descriptors (BRISK, ORB). These alternative approaches are faster than SIFT and produce alignments equivalent to patch-based approaches. Keywords : Alignment, Electron tomography, Feature detection, Binary descriptor.

A.2 Présentations orales

A.2.1 Multi-Scale Simultaneous Alignment and Reconstruction : Tool for tomography from full or sparse tilt-series

juillet 2019, 16^{ème} colloque de la Société Française des Microscopies (SFμ), Poitiers (France)

Abstract

Over the last decade, the application of compressed detection algorithms for tomography has been developed (1,2). Because of data sparsity, the alignment of tilt series is a major problem. Standard alignment algorithms based on fiducials or automatic feature recognition cannot be used on sparse data. Therefore, as long as the problem of sparse data alignment is not solved, the use of compressed sensing for tomography reconstruction will be limited. We propose here a new iterative reconstruction algorithm : multi-scale simultaneous alignment and reconstruction (MS-SAR). There are two main ideas in this algorithm : i) the ability to recover missing information from sparse data thanks to the multi- scale approach and ii) the optimization of the reconstruction process where alignment and reconstruction are merged in a single step. The MS-SAR workflow (figure 1) yields the different steps of the algorithm. It starts with size reduction of the original tilt-series. This allows recovering missing information in the case of sparse data. This occurs during the upscale step of the reconstruction. We have tested MS-SAR on phantom and on experimental tomographic tilt series with or without simulation of sparse acquisition (figure 2). Our results showed the interest of MS-SAR for the alignment of sparse data. In addition, since MS-SAR also works on non- sparse data, its specificity of including alignment and reconstruction in a single step can help the automation of tomographic reconstruction process. It will be integrated in TomoJ (3).

Acknowledgment :

We are grateful to Sylvain Trpout for tilt-series, artwork and useful discussions on sparse data simulation. Amandine Verguet is recipient of a CIFRE. References :

(1) Saghi Z. et al., Ultramicroscopy, 179 (2017), 47-56.

(2) Donati L. et al., *Ultramicroscopy*, 179 (2017), 47-56.

(3) Messaoudi C. et al., *BMC Bioinformatics*, 8 (2007).

A.2.2 Evaluation of feature based approaches for alignment of tilt series without fiducial markers

2018 : International Microscopy Congress (IMC19), Sydney (Australie)

Abstract

Electron tomography is an important method in electron microscopy as it gives information about 3D structures of samples. Nevertheless, in order to get high resolution reconstruction, alignment of tilt series is mandatory. Most of the time, fiducial markers are added to samples in order to help achieving fine alignment. However, the use of fiducial markers has some drawbacks such as shadowing the structures of interest. The alignment methods using fiducial markers rely on detection of markers in the images. Alignment is then produced by creating a 3D model of the features. Other approaches propose replacing the fiducial markers by features existing on the original image. Those are points with special characteristics such as local minima (1) or corners (2). Han R. et al (3) proposes to use SIFT (Scale Invariant Feature Transform (4)), a recent feature detection and description algorithm used in image registration or object detection algorithms. Our purpose is to evaluate the interest of new feature descriptors (SURF (5), ORB (6), BRISK (7), KAZE (8) and AKAZE (9)) compared to SIFT and to determine the robustness of these features for electron transmission microscopy on material science and biological samples. The evaluation is first done on 2D images in order to check the efficiency of each descriptor (figure 1) for electron microscopy acquired at different tilt angles. The analysis is then pursued on 3D reconstruction (figure 2), with the presentation of a workflow used to create chains of features seen on many images in the tilt series. The final alignment of tilt series is performed with a classical approach using the creation of 3D model of features. The whole process is integrated in the TomoJ software, thus offering the opportunity to mix the different methods of feature detection and description.

References :

(1) Sorzano C.O. et al. Marker-free image registration of electron tomography tilt-series. *BMC Bioinformatics*, 2009.

(2) Brandt S. et al. Automatic alignment of transmission electron microscope tilt series without fiducial markers. *J Struct Biol*, 136, 2001.

(3) Han R. et al. A marker-free automatic alignment method based on scale-invariant feature. *J Struct Biol*, 186, 2014.

(4) Lowe D. Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *International Journal of Computer Vision*, 2004

(5) Bay H., et al. Speed-Up Robust Features (SURF). *Sciencedirect*, 2007.

(6) Rublee E.. et al. ORB : An efficient alternative to SIFT of SURF. *IEEE International Conference on Computer Vision*, 2011.

(7) Leutenegger S. et al. BRISK : Binary Robust invariant scalable keypoints. *IEEE International Conference on Computer Vision*, 2011.

(8) Alcantarilla P. F. et al. KAZE features. *European Conference on Computer Vision*, 2012.

(9) Alcantarilla P. F. et al. Fast Explicit Diffusion for Accelerated Features in Nonlinear Scale Spaces. *British Machine Vision Conference*, 2013.

A.2.3 Energy Filtered STEM evaluation using biological samples

2017 : Cercle des Microscopistes JEOL (CMJ), Montpellier (France)

Abstract

STEM tomography (STET), together with FIB-SEM and SBF-SEM is becoming a tool of choice in cell biology for the study of thick specimens. In cryo-samples STET has demonstrated its ability to reduce beam damage maintaining contrast and signal-to-noise ratio (1,2). Recently, STEM has been combined to EELS in a theoretical study for material sciences of HAADF mode in two dimensions (3). Here we analyze the interest of this approach for biological samples by combining STEM acquisition in BF-mode to Z-loss filtering. To this purpose we have used EF-STEM images of cryo- samples and resin embedded thick sections to evaluate its potential for biology. We have determined the best scan-speed, and acquisition parameters leading to the best signal to ratio improvement in both resin and frozen hydrated samples. Our results support that combination of Z-loss imaging and STEM can be used for details enhancement in STEM tomography

References :

- (1) Wolf S. et al. *Nature Methods* 11 (2014) 423.
- (2) Rez P. et al. *J Struct Biol* 196 (2014) 466.
- (3) Donati L et al. *Ultramicroscopy* 179 (2017) 47.
- (4) LM Liz-Marzn et PV Kamat. *Nanoscale Materials*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2003.

A.2.4 Shift and SIFT

2016 : Séminaire inter-unité, Domaine 1, Centre de recherche de l'Institut Curie, Orsay (France)

Abstract

Despite the high performance achieved in goniometers-control for tomographic tilt series recording, image alignment is mandatory to obtain accurate reconstructions. In addition, due to the high resolution currently expected from tomograms, the existing alignment methods (based on cross-correlation, fiducial-markers and landmarks) needs to be improved. Among the alternative methods presently proposed to align images, Scale Invariant Feature Transform (SIFT) (1) has demonstrate its performance for the detection of common features occurring in several images. SIFT have been successfully used for panoramic stitching (2), object detection (1) and proposed as a method for image alignment in electron tomography (3). We have implemented this algorithm in TomoJ and evaluated its performance on data from different transmission electron microscopy (TEM) acquisition methods (TEM, EFTEM, STEM, and Cryo-TEM). We will present here the results obtained validating the use of SIFT on the different acquisition modes.

References :

- (1) Lowe D.G. Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *Int. J. Comput. Vision*. 2004. 60 :91-110
- (2) Brown M. and Lowe D.G. Automatic Panoramic Image Stitching using Invariant Features. *Int. J. Comput. Vision*. 2007. 74 :59-73
- (3) Han R, Zhang F, Wan X, Fernandez JJ, Sun F, Liu Z. A marker-free automatic alignment method based on scale-invariant features. *J Struct Biol*. 2014. 186 :167-80.

A.3 Posters

A.3.1 Simple Phase Contrast Imaging (SPCI) : An ImageJ tool for TEM

Verguet A., Messaoudi C., Marco S., Donnadiou P.
International Microscopy Congress (IMC19), septembre 2018, Sydney (Australie)

A.3.2 Energy Filtered STEM in bright field mode and its evaluation for biological samples

Verguet A., Trépout S., Ravelle-Chapuis R., Tassin A.M., Lemullois M., Messaoudi C., Marco S.
15^{ème} Colloque de la Société Française des Microscopies (SFμ), juillet 2017, Bordeaux (France)

A.3.3 An ImageJ plugin for simplified inline holography

Verguet A., Messaoudi C., Ravelle-Chapuis R., Marco S., Donnadiou P.
15^{ème} Colloque de la Société Française des Microscopies (SFμ), juillet 2017, Bordeaux (France)

A.3.4 Methodological and computing development for cryo-STEM tomography of biological sample

Verguet A., Ravelle-Chapuis R., Messaoudi C., Marco S.
Journée de l'Ecole Doctorale, novembre 2016, Saclay (France)

A.3.5 Evaluation of feature-based registration algorithms for the improvement of tilt-series alignment in electron tomography

Verguet A., Trépout S., Messaoudi C., Marco S.
European Microscopy Congress (EMC), août 2016, Lyon (France)

Annexe B

Chapitre 3

Article - Comparison of methods based on feature tracking for fiducial-less image alignment in electron tomography

Comparison of methods based on feature tracking for fiducial-less image alignment in electron tomography

Verguet Amandine, Marco Sergio et Messaoudi Cédric.

En révision depuis juillet 2019.

Comparison of methods based on feature tracking for fiducial-less image alignment in electron tomography

Verguet Amandine^{a,b,c,*}, Marco Sergio^{b,c,d}, Messaoudi Cédric^{b,c,*}

^aJEOL (Europe) SAS, allée de Giverny, F-78290 Croissy-sur-Seine, France

^bInstitut Curie, PSL Research University, CNRS UMR9187, F-91405 Orsay, France

^cUniversité Paris-Sud, Université Paris-Saclay, INSERM U1196, F-91405 Orsay, France

^dpresent address: Sanofi Pasteur, avenue Marcel Merieux, F-69280 Marcy L'Etoile, France

Abstract

Current studies in electron microscopy often rely on tomographic reconstruction to obtain 3D maps of a sample. During tilt-series acquisitions, instrumental instability produces shifts between images. However, reconstruction algorithms require a correct geometric relationship between images. Thus, image alignment is necessary to obtain accurate reconstructions. The first step of current alignment methods is based on cross-correlation, followed by fiducial-markers or patch-based tracking. Since 2004, algorithms based on scale invariant feature transform (SIFT) have proliferated in various fields, such as video detection and image alignment. The use of SIFT has been proposed for tilt-series alignment in electron tomography. Alternatives to SIFT that can reduce computing time and increase accuracy have been more recently published. However, they have not been tested for electron tomography. Here, we evaluate several of the feature-tracking methods developed over the last decade and investigate their suitability for tomographic tilt-series alignment. We focus particularly on approaches based on nonlinear-scale space (KAZE) and binary descriptors (BRISK, ORB). These alternative approaches are faster than SIFT and produce alignments equivalent to those of patch-based approaches.

Keywords: Alignment, Electron tomography, Feature detection, Binary descriptor.

Highlights:

- Fiducial-less image alignment for 3D reconstruction
- Comparison of feature-detection algorithms for electron microscopy images
- Improvement of computing time and accuracy for tilt-series alignment

Abbreviations: SIFT, Scale Invariant Feature Transform; SURF, Speed Up Robust Features; M-SURF, Modified-SURF; BRISK, Binary Robust Invariant Scalable Keypoints; AOS, Additive Operator Splitting technique; MLDB, Modified Local Difference Binary; DoG, Difference of Gaussian; AGAST, Adaptive and Generic Corner Detection Based on the Accelerated Segment Test; FAST, Features from Accelerated Segment Test; AKAZE, Accelerated-KAZE; ORB, Oriented FAST and Rotated BRIEF; BRIEF, Binary Robust Independent Elementary Feature; RANSAC, RANdom SAmple Consensus

*Corresponding authors at: Institut Curie Bat 112 Campus Universitaire, 91045 Orsay cedex.
E-mail address: amandine.verguet@ssji.net and cedric.messaoudi@curie.fr

1. Introduction

Electron tomography has become a method of choice for three-dimensional (3D) structural studies performed by transmission electron microscopy (Kovtun et al., 2018), (Mattei et al., 2018). However, the reconstruction process requires projection images placed in the correct geometric system to work properly. For example, the sample should be tilted around one axis, without shifts or deformations. In spite of improvements in the ability of software to perform sample tracking, it is not yet possible to precisely compensate for mechanical drift. Therefore, post-acquisition alignment is still necessary to compute accurate reconstructions. Various approaches have been proposed to address this problem. Approaches based on cross-correlation (Frank and McEwen, 1992), are limited by cumulative error propagation (Brandt et al., 2001). This can be prevented by adding fiducial markers, such as gold beads, to the sample. The advantage of gold beads is that they are high-density spherical objects that can be easily tracked. Their central coordinates can then be used to build 3D models for shift corrections (Mastronarde, 2007), (Sorzano et al., 2009). In the classic approach, the selection of fiducials requires the input of users concerning the location on one image prior to tracking. This can be facilitated by the automatic detection of fiducials, as proposed by several authors (Amat et al., 2008), (Mastronarde and Held, 2017). Alternatively, the use of marker-free methods has been proposed (Castaño-Díez et al., 2010), (Winkler and Taylor, 2006), (Sorzano et al., 2009). Marker-free methods use points in the images that can be positioned randomly (Castaño-Díez et al., 2010) on a regular grid (Sorzano et al., 2009) or localized based on certain characteristic features (Brandt and Heikkonen, 2000). As for gold beads, the coordinates of the points are then tracked by cross-correlation to build the 3D model used for the alignment.

Marker-free methods have also been proposed in the field of general image registration. Characteristic points can be detected as local extrema and described by a unique vector. Vectors from two images can then be compared and used as fiducial markers. This approach, called Scale-Invariant Feature Transform (SIFT), was proposed in 2004 (Lowe, 2004) and is implemented in the OpenCV library (Bradski, 2000). More recently, SIFT has been proposed for the alignment of tomographic tilt-series (Han et al., 2014). Although the efficiency of this approach has been proven on tomographic tilt series, either without the addition of fiducial markers or by manual intervention, SIFT has not been proven to be the best algorithm for characteristic-based feature detection. Since 2004, other characteristic-based feature-detection algorithms (SURF, ORB, BRISK, KAZE, AKAZE) have been implemented in the OpenCV library. Here, we adapted the alignment workflow to test these algorithms and studied their robustness for the alignment of tomographic tilt series. In addition, we integrated all these algorithms in the ImageJ plugin for tomography: TomoJ (Messaoudi, 2011). This provides the advantage of accurate refinements during the marker-free alignment process.

We chose detectors and descriptors that are currently available in OpenCV to estimate the efficiency of the algorithms for electron tomography. The retained algorithms were SIFT as the reference; SURF, because it is faster than SIFT and is widely used in the field of feature matching; BRISK and ORB, because they use binary

descriptors, in which the information is boolean values stored in the bits of an integer; and finally KAZE, as well as its accelerated variant AKAZE, which use nonlinear-scale space.

2. Methods

The classical workflow for aligning tilt series begins with a pre-alignment, usually using cross-correlation between consecutive images. Then, manual, guided, or fully automatic tracking of features, such as gold-beads, is performed. Finally, modelling of the 3D feature produces the alignment for reconstruction. SIFT and other specific descriptors for the tested features do not require the first pre-alignment step.

We propose a general workflow as an alternative to the classical one:

- detection of the features and computation of the corresponding descriptor for each image
- matching of interest points between images
- chaining of interest point matches
- alignment of images based on 3D model using chains (previous step)
- 3D reconstruction.

2.1. Detector and descriptor

We compare various algorithms for the detection of feature characteristics. As recent algorithms were inspired by SIFT, we first describe this algorithm. We then study the modifications leading to SURF, KAZE, BRISK, and ORB. These algorithms are all composed of two main functions: the detection of interest points and the definition of a unique descriptor based on the neighborhood for each interest point. Thus, each interest point is identified by its coordinates in the image (x,y) and a unique descriptor. In addition, such descriptors are orientation independent. The detection of interest points in the **SIFT** (Lowe, 2004) algorithm uses a pyramidal approach. First, the original image is scaled down several times to obtain several images known as *octaves*. Then, for each octave, a difference of Gaussian (DoG) is obtained by filtering, using an increasing Gaussian filter.

$$D(x, y, \sigma) = L(x, y, k_i \sigma) - L(x, y, k_j \sigma)$$

where $D(x, y, \sigma)$ is the DoG of the image of interest. We obtain

$$L(x, y, k\sigma) = G(x, y, k\sigma) * I(x, y)$$

where $L(x, y, k\sigma)$ corresponds to the convolution of $I(x, y)$ the image of interest with the application of $G(x, y, k\sigma)$ a Gaussian blur at different scales $k\sigma$.

This allows the detection of the local extrema based on local gradients. Then, a descriptor for each detected point is created based on the obtained histogram of orientation, with the local gradient around the point. A scale value is also associated with each interest point and is an overall indicator of the Gaussian level and the octave from which that interest point was selected. This descriptor is unique for each interest point of the image. The SIFT algorithm was chosen as the reference because it was the first of its kind and is the best-known algorithm in the field. In addition, it was the algorithm chosen by Han *et al.* in 2014 on which this family of algorithms was based for electron tomography. The main parameters are the number of octaves, as well as the sigma of the Gaussian filter kernel used to create the pyramidal DoGs. The contrast and edge thresholds must also be adjusted to extract features with high contrast and a strong edge response. Other algorithms use the same two steps: the detection of interest points and the creation of a unique descriptor.

SURF (Speed Up Robust Features (Bay et al., 2008)) is the second most well-known descriptor-based algorithm. It is similar to SIFT and was designed to speed-up the computation by using a determinant of Hessian matrix at different scales instead of DoG. We included it in the study to test its performance on electron tomography images. A Hessian matrix corresponds to 2nd order derivatives of intensities.

$$H(x, y) = \begin{pmatrix} \frac{d^2 I(x, y)}{dx^2} & \frac{d^2 I(x, y)}{dx dy} \\ \frac{d^2 I(x, y)}{dx dy} & \frac{d^2 I(x, y)}{dy^2} \end{pmatrix}$$

Its determinant makes it possible to find interest points. To build the descriptor for a given point, the dominant orientation is determined in a circular neighborhood of the detected point, split into smaller square sub-regions. For each sub-region, the Haar wavelet responses in the x and y directions are computed and weighted with a Gaussian. The 2×2 haar wavelet matrix is defined as:

$$H_2 = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{pmatrix}$$

The weighted sum of responses defines the dominant orientation. Then, a square region is centered around the detected point and oriented along this dominant orientation. The region is split into smaller 4×4 square sub-region and the Haar wavelet responses (filter size $2 \times scale$) are extracted for each at 5×5 regularly-spaced sample points and stored in a vector. The responses are weighted with a Gaussian to offer robustness for deformations, noise, and translation.

KAZE (Japanese word that means *wind* (Alcantarilla et al., 2012)) is similar to SIFT but uses non-linear diffusion filtering instead of Gaussian blurring to better maintain the boundaries in the images. We included this algorithm to evaluate the relevance of non-linear filtering in our case. It may provide improved stability in the detection of features at different tilt angles, as non-linear filtering should conserve borders and corners during multiscale detection. The main parameters are the number of octaves and layers used for the creation of the pyramidal nonlinear-scale space and the threshold used to extract features. The nonlinear-scale space is built using an additive operator splitting technique (AOS) (Weickert et al., 1998). The interest points are found using the scale-normalized determinant of the Hessian matrix. For the descriptor, KAZE uses a variant of SURF, modified-SURF (M-SURF (Huang et al., 2010)), which handles descriptor boundary effects better and uses a more robust weighting scheme. M-SURF was adapted to use the nonlinear-scale space. An accelerated version of KAZE has been proposed (AKAZE for Accelerated-KAZE (Alcantarilla et al., 2013)). Speed-up was obtained by improving the computation of the nonlinear-scale space and modifying the descriptor. The computation of the nonlinear scale space is performed by a fast-explicit diffusion framework combined with a pyramidal approach, instead of an AOS scheme. The descriptor is exchanged for a binary descriptor, the modified local difference binary (MLDB), which is rotation and scale invariant and exploits the nonlinear-scale space.

BRISK (Binary Robust Invariant Scalable Keypoints (Leutenegger et al., 2011)) detection uses adaptive and generic corner detection, based on the accelerated segment test (AGAST (Mair et al., 2010)) algorithm to improve the performance of the FAST (Features from Accelerated Segment Test (Rosten and Drummond, 2006)) algorithm. This algorithm was included in the study to test the pertinence of binary descriptors for electron tomography images. Between the numerous binary descriptors available, we chose BRISK based on the conclusion of the comparison performed by Miksik and Mikolajczyk (Miksik and Mikolajczyk, 2012). The main parameters are the number of octaves in the pyramidal scale space and the threshold used to extract features. An additional parameter is the pattern scale, corresponding to the neighborhood radius used to create the descriptor. This parameter can help to remove some of the variability due to noise. The FAST detector uses a circle around a candidate point p to classify whether it is a corner. If a set of N contiguous pixels in the circle are all brighter or darker than the intensity of the candidate pixel p , with a tolerance threshold value, then p is classified as a corner. Like SIFT and SURF, this detection method is applied on a linear scale-space pyramid with the various octaves. The description of detected points uses a binary descriptor. To build such a binary descriptor, a pattern is defined around the interest point. This yields a vector of boolean values. In the case of BRISK, this pattern consists of concentric circles. Then a number of point pairs are selected in the sampling and the intensity between the two points in each pair are compared. The boolean value is 1 when the value of the first point is greater than the second. Performing this for all pairs gives the overall direction of the pattern. This binary vector displays local information around the interest point and makes it unique.

ORB (Oriented FAST and Rotated BRIEF (Rublee et al., 2011)) is mainly based on the FAST algorithm for detection of the point of interest and a binary descriptor: Binary Robust Independent Elementary Features (BRIEF (Calonder et al., 2010)). This algorithm was chosen because it was another binary descriptor recommended in the study of Miksik and Mikolajczyk (Miksik and Mikolajczyk, 2012). The main parameters are the number of levels and the scale factor between levels (all other algorithms use a scale factor of 2) to create the pyramidal-scale space, a threshold value to extract features, the size of the descriptor, and an edge threshold corresponding to the distance to the image border where features will not be considered. ORB adopts a linear scale-space approach, in which the FAST detector is run independently for each octave of a Gaussian pyramid. Then, the Harris corner response and orientation angle are computed for each detected key-point, instead of the FAST response. Each point of interest is then described by a binary vector based on BRIEF, modified to be rotation aware.

2.2. Matching of features

Each point found with the various algorithms has a descriptor that is unique in one image. When the algorithms are applied on two similar images, the points found should be mostly the same and the corresponding descriptors should be very similar. The matching of the detected points from two images is performed by computing the difference between the two sets of descriptors to retain those with only the smallest differences as matching pairs. The computation of difference is performed in several ways depending on the type of descriptors. When the descriptor is a vector of real or integer values (SIFT, SURF, KAZE), the algorithms use the Euclidean distance, defined as :

$$d_{euclidean}(a, b) = \sqrt{\sum_{n=1}^N |a_n - b_n|^2}$$

where a and b are two vectors of dimension N .

When a binary descriptor is used, such as in the ORB, BRISK, or AKAZE algorithms, the difference used is the Hamming distance. The Hamming distance is defined as the number of differing bits between the two vectors (stored in an integer). It is computed by finding the number of non-zero bits in the Exclusive Or (XOR) operation between the two binary vectors. It is described by

$$d_{hamming}(a, b) = \sum_{n=1}^N (a_n \oplus b_n)$$

where a and b are two vectors of dimension N and \oplus is the Exclusive Or operation.

The matching of features between two images in the described approaches is performed using brute force matching. Brute-force matching compares every descriptor from the reference image to every descriptor in the other image.

To reject close descriptors that are actually wrong matches, Lowe proposes the best-bin-first algorithm (Beis and Lowe, 1997). It consists of obtaining the two best matches for each feature and computing the ratio between the corresponding Euclidean distances. If the ratio is higher than a user threshold, the match is accepted. Another possibility is to use a cross-validation process. This process checks whether the best match of a feature in image 1 found in image 2 gives back the original feature as the best match if used as reference for a match between image 2 and image 1. This method is used by all other algorithms and can be used with SIFT as well.

2.3. Matching adaptation for tomographic tilt-series

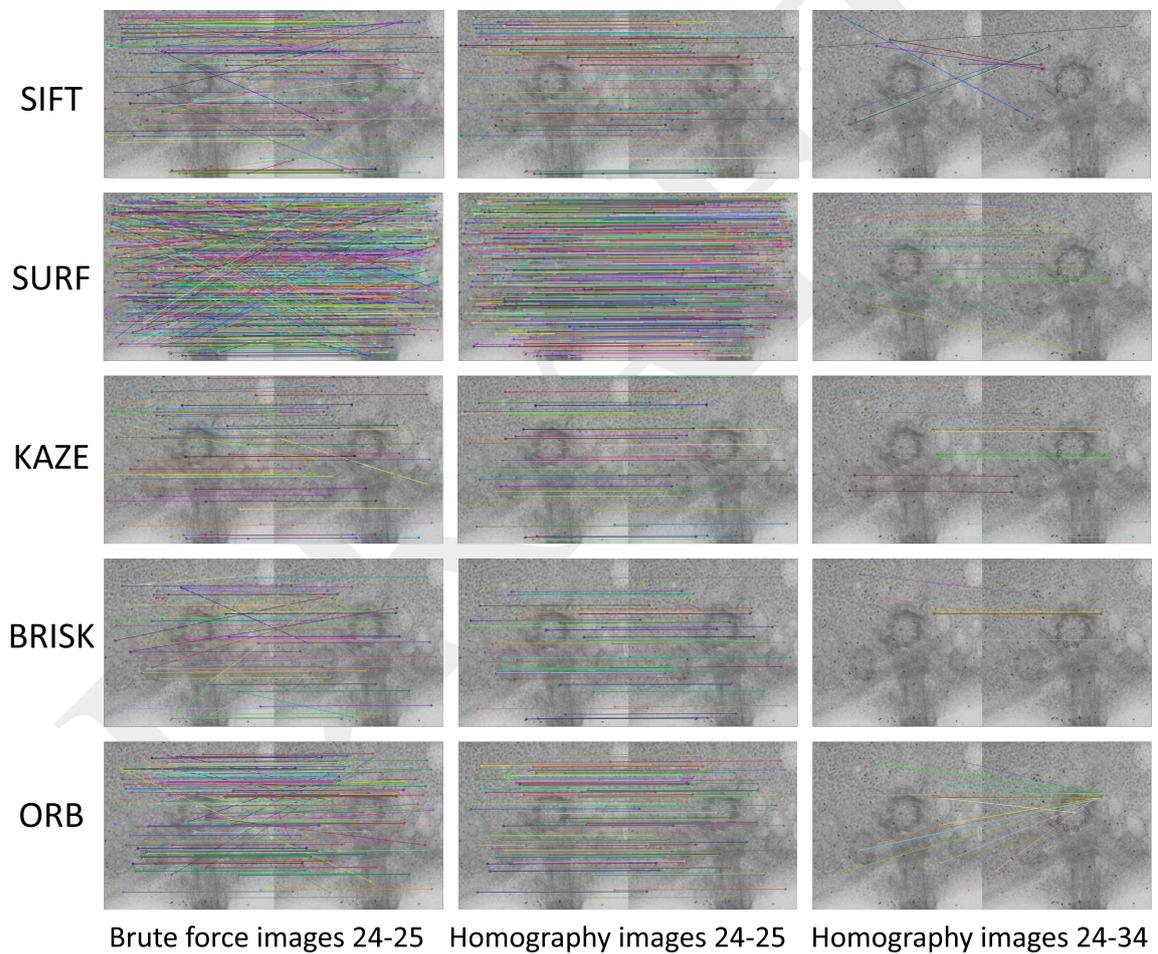


Figure 1: The result after brute-force matching of IMOD data test BBa on two consecutive images of the series (24-25) and after homography validation on two consecutive images of the series (24-25) and two images of the series with a jump of ten images (24-34). The colored lines link matched points between images.

The matches found do not always result in a good match between the two images (Figure 1, no parallel lines or heterogeneity in line lengths). The matching features may well be in different parts of the images and are thus not consistent with the image formation model. A validation step is added to remove any incoherent matching by finding a relation between the images. In the case of tilt series, the difference between two images at different tilt angles can be approximated with an affine transform or, better yet, with homography. Homography is a transform that changes the projective orientation of a plane. We use the random sample consensus (RANSAC) algorithm (Fischler and Bolles, 1981) to find such homography using two sets of points, which allows the removal of outliers. The principle of RANSAC is to randomly select a few pairs of points to determine the homography between the two images. The quality of this transform is evaluated by applying the transform to all points from the first image and counting the number of transformed points situated in a fixed radius of the corresponding matched pair. The random selection is performed many times and the homography obtaining the highest number of concordant points is retained. Once the homography is found, a second pass is performed to catch features with a lower matching score. These are added to the list of matches if validated by this model.

Such matching can be performed between consecutive images in a series. It is possible to allow a feature to be missing in some intermediate images due to shadowing by other features or simply because they were not correctly detected. The descriptors are designed to be rotation and scale invariant and thus, matching can still be performed with a higher range of tilt angles between the images.

2.4. Chaining

As already briefly mentioned, the alignment of tilt series is based on chains of features detected in many images to produce a 3D model. The goal is thus to find the features present in many images from the feature pairs found by the algorithms between image pairs in the tilt series. Chaining is performed as described below.

A chain of features is created by taking a match between the first two images and checking whether the feature in second image also has a match in the third image. Every feature found in this way in the third image is then checked with the fourth image and so on until no more matches for the feature are found. This procedure is repeated for all matches, starting with the first image. The procedure is then applied again by restarting from different images in the tilt-series.

As some features may not be detected in all consecutive images, the possibility to jump is considered by checking at the end of the track whether a matching feature can be found on images that are not directly consecutive. The pseudo-code for the proposed chaining algorithm is listed in Algorithm 1. From a computational point of view, fast chaining of features was obtained by storing the matches in hash tables. This allows fast testing for the presence of any feature.

Algorithm 1 Pseudo-code of chain creation with jump

Require: Array of list of features matches between two images

```
1:  $jump = 1$ 
2:  $i = startImage$ 
3: for  $match$  in  $arrayOfList[i]$  do
4:    $Extract(feature1)$ 
5:    $Extract(feature2)$ 
6:    $CreateChain(i, feature1)$ 
7:   while ( $feature2 \neq null$ ) do
8:      $AddFeatureToChain(i + jump, feature2)$ 
9:      $i = i + jump$ 
10:     $feature1 = feature2$ 
11:   repeat
12:      $feature2 = FindMatch(feature1, i + jump)$ 
13:      $jump++$ 
14:   until ( $feature2 \neq null$ ) || ( $jump > jumpMax$ )
15: end while
16: end for
```

2.5. Producing alignment and 3D reconstruction

The chains were used as input for alignment using a 3D model (Sorzano et al., 2009). To summarize, the relationship between the 3D coordinate of the j^{th} point in the volume (r_j) and the 2D coordinate of its projection on image i (p_{ij}) is expressed as

$$p_{ij} = A_i r_j + d_i$$

where A_i is the projection matrix of the i^{th} image, accounting for tilting around the tilt axis and d_i is in-plane shift. A_i is computed as

$$A_i = m_i H R_{\psi_i} R_{\theta_i}$$

where m_i is the magnification factor for i^{th} image, H the projection operator, R_{ψ_i} the in-plane rotation and R_{θ_i} the tilt of i^{th} image.

Optimization consists of finding the parameters by minimizing the error E between the projections of the 3D landmark experimentally observed and the projection using the theoretical model below:

$$E = \sum_{ij} \|p_{ij} - (A_i r_j + d_i)\|^2$$

Details about the parameter determination are published in (Sorzano et al., 2009). Reconstruction algorithms then use these aligned images to produce the 3D reconstruction. As the goal of this paper was not to test the capabilities of the latest algorithms, the ART algorithm (Messaoudi et al., 2007) was used.

3. Results

The proposed workflow is implemented in TomoJ software (Messaoudi, 2011). For implementation of the detectors and descriptors we choose the OpenCV library. We used JavaCV (Audet, 2015) wrapper which permits the use of openCV functions directly from the Java code. This enabled the integration of the algorithms into TomoJ. The chaining of features was implemented in Java and incorporated into TomoJ as well. The subsequent alignment with a 3D model and reconstruction uses the OS-SART (Wang and Jiang, 2004) algorithm.

3.1. 2D applications

The Imod data test (BBa image) was used for the evaluation of these five algorithms. In each case, two couples of images were used to perform the analysis: two successive images (2°tilt-step) and two images with a gap of 10 images between them (20°tilt-step). A gap of of this size is important to show the response of the algorithms to extreme differences of the tilt-angle between images.

Several parameters for each algorithm are compared in Table 1, including the difference in the number of interest points obtained after the detection step and the execution time for this step and creation of the descriptor. The execution time values are based on the average of 100 consecutive tests. The default parameters mode of

each algorithm was applied for this 2D application. The goal was to evaluate the application of this algorithm on images from electron transmission microscopy acquisition.

The execution time of the detection varied between the algorithms and depended on the number of interest points obtained by each algorithm. Nevertheless, the values were notably consistent for two consecutive images and those with a jump.

Images	Descriptor	Feature number by img	Execution time (s)
BBa img 24-25 (tilt-step 2°)	ORB	477-477	0.7374
	BRISK	149-151	0.0166
	SIFT	250-251	15.044
	SURF	1641-1577	4.3657
	KAZE	109-117	40.0559
BBa img 24-34 (tilt-step 20°)	ORB	477-483	0.765
	BRISK	149-154	0.0587
	SIFT	250-250	15.98
	SURF	1641-1624	4.510
	KAZE	109-100	40.081

Table 1: Evaluation of the detection step of the algorithms applied to consecutive tomographic images and those separated by nine images. Values correspond to the average of 100 consecutive tests. The fastest algorithm is highlighted in bold. The tests were performed on Intel Core i7-4930K at 3.40 GHz.

Once the interest points were obtained, the second step consisted of searching for matches between the image pairs (Table 2). Two consecutive images yielded a ratio between the good matches and the total number of matches of $> 70\%$. The jump of 10 images showed a substantial decrease in this ratio, with the best value for the KAZE algorithm and BRISK of $> 10\%$.

Images	Detector Descriptor	Match number	Good match number	Ratio (%) (gMatch/nbMatch) * 100
BBa img 24-25 (tilt-step 2°)	ORB	332	280	84.34
	BRISK	102	87	85.3
	SIFT	169	130	76.92
	SURF	1040	743	71.44
	KAZE	79	74	93.67
BBa img 24-34 (tilt-step 20°)	ORB	247	19	7.7
	BRISK	77	11	14.3
	SIFT	125	12	9.6
	SURF	857	15	1.75
	KAZE	51	13	25.5

Table 2: Evaluation of the matching step of algorithms applied to consecutive tomographic images and those separated by nine images. Values correspond to the average of 100 consecutive tests. The fastest algorithm is highlighted in bold.

3.2. 3D reconstruction

The 2D analysis showed the SIFT descriptor to give good results, but with a long computation time. SURF and ORB were faster (Table 1), but their stability was poorer than that of SIFT. This was proven by the ratio of good matches with images with a 20° tilt (Table 2). BRISK and KAZE displayed better stability than SIFT (Table 2) with BRISK being the fastest and KAZE being the slowest of all algorithms (Table 1). For the 3D analysis, we concentrated on SIFT (as the reference for feature-based approaches), KAZE for the use of a nonlinear-scale space, AKAZE, its accelerated version, and BRISK and ORB for binary descriptors. Patch-tracking with grid initialization (Sorzano et al., 2009) or using local minima detection were added as reference algorithms often used in electron tomography.

The described workflow was applied to the acquisition of *Trypanosoma brucei* cilia embedded in Epon (Trépoint et al., 2018). Electron tomography was performed using a JEM 2200FS microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 200 KeV in STEM bright-field mode. The tilt series ranged from -75.62° to +77.62°, with a Saxton scheme (Saxton et al., 1984), for a total number of 97 images. The images of 2048 × 2048 pixels were recorded at nominal magnification of 100,000X with a pixel size of 1.46 nm. This dataset is provided as a test sample for TomoJ software. The images were binned by a factor of two before processing. A first step of alignment using cross-correlation of consecutive images was needed for patch tracking. This was performed in two steps: the first with a centered region of interest of 720 × 720 pixels, followed by the binning of two to increase the signal-to-noise ratio, and the second with a central region of interest of 360 × 360 pixels. The algorithm was applied using the following global parameters of the workflow: the minimum length of chains was 15 images, with a maximum allowed jump of five images, and a precision of homography validation of five pixels. All algorithms used the cross-validation method for the matching validation. A zoom of an image at zero tilt with the points detected by each algorithm is shown in Figure S1. The points were notably different for all algorithms. Although gold beads were present in the sample, many were not considered to be good candidates by the algorithms. This was expected, as gold beads all have a similar shape and only the neighborhood can differentiate one from another. Many other features are better candidates than gold beads in samples with high contrast. In cryo-tomography, the high contrast of gold beads relative to that of the sample could have biased the analysis, as they would have been the main features detected.

The parameters were adjusted to obtain approximately 3,000 chains (between 3,022 and 3,341) to compare the intrinsic performance of the algorithms. Analysis of the chains is presented in Table S2. The chains had a minimum size of 16 images, as fixed in the procedure. Some features were detected in almost all images: maximum length between 86 and 95 images for a tilt series of 97 images. However, the average length of approximately 24 images for all algorithms shows that most of the chains were short, confirmed by the median length of 21 for all algorithms. The possibility of having missing images during tracking is crucial for obtaining a high number of chains. This is shown by the number of chains with jumps: approximately 60% for KAZE and AKAZE and approximately 90% for SIFT, BRISK, and ORB. The Chains were still well defined, with

Algorithms	detection time	alignment time	total time	alignment score	percentage of good landmarks	rank score
BRISK	0:21:37	0:20:58	0:42:35 (2)	1.14 (2)	93.59 (1)	5
AKAZE	0:10:57	0:24:27	0:35:24 (1)	1.15 (3)	90.33 (4)	8
SIFT	1:45:21	0:26:03	2:11:24 (7)	0.99 (1)	92.70 (2)	10
patch tracking (LM)	0:08:41	0:34:39	0:43:34 (3)	1.17 (4)	83.29 (6)	13
ORB	0:21:51	0:27:35	0:49:26 (5)	1.38 (6)	92.63 (3)	14
KAZE	0:35:21	0:23:52	0:59:13 (6)	1.33 (5)	87.89 (5)	16
patch tracking (grid)	0:18:43	0:24:48	0:43:45 (4)	2.37 (7)	18.50 (7)	18

Table 3: Scores of each algorithm for the computation of the complete alignment procedure: detection and alignment time. Time is displayed using the format hh:mm:ss. The alignment score corresponds to the average error between reprojections of features and the features detected by the algorithms. The percentage of good landmarks corresponds to the ratio of the number of landmark chains at the end of the procedure to the number of landmark chains at the beginning. The numbers in parenthesis correspond to the rank of the algorithm in the evaluated score. The final rank score corresponds to the sum of the rankings. The best scores or times are highlighted in bold. The tests were performed on Intel Xeon E5-2650 at 2.20 GHz.

90% of the images in the chains presenting points for KAZE and AKAZE, 80% for SIFT and BRISK, and 72% for ORB. Most jumps were of only one image and the median number of jumps per chain was between one and three. The alignment score obtained was close for all tested algorithms, except for patch tracking with grid initialization (Table 3). SIFT obtained the best score, with an average error between coordinates of the projection of 3D landmarks and the coordinates of detected landmarks below one pixel. BRISK, AKAZE, and patch tracking using local minima detection were the next best, with a score just above one pixel. ORB and KAZE showed higher error, with a score of approximately 1.35 pixels. Patch tracking with grid initialization was the worst, with a score of 2.37 pixels. In terms of computation time (Table 3), SIFT took more than two hours to compute the alignment using only one thread for comparison, whereas all other approaches took less than one hour, with the best being AKAZE, which only took 35 minutes. However, in terms of the percentage of good landmark chains (Table 3), BRISK, SIFT, and ORB showed an impressive ratio of 92-93%, whereas patch tracking with grid initialization obtained a low ratio of only 18%. We created a score to classify the efficiency of the algorithms by summing their ranks for computation time, alignment score, and percentage of good landmarks. Based on this global score, BRISK appears to be the best performing, followed by AKAZE and SIFT. The patch-based approach using local minima detection was fourth. ORB, KAZE, and the patch-based approach with grid initialization were the least performant.

Close inspection of the reconstruction mostly confirmed the values of the alignment score. The reconstructions in Figure 2 present the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei* (Buisson and Bastin, 2010), containing a flagellum composed of an axoneme and a paraflagellar rod (PFR). The XY plane of *Trypanosoma brucei* ob-

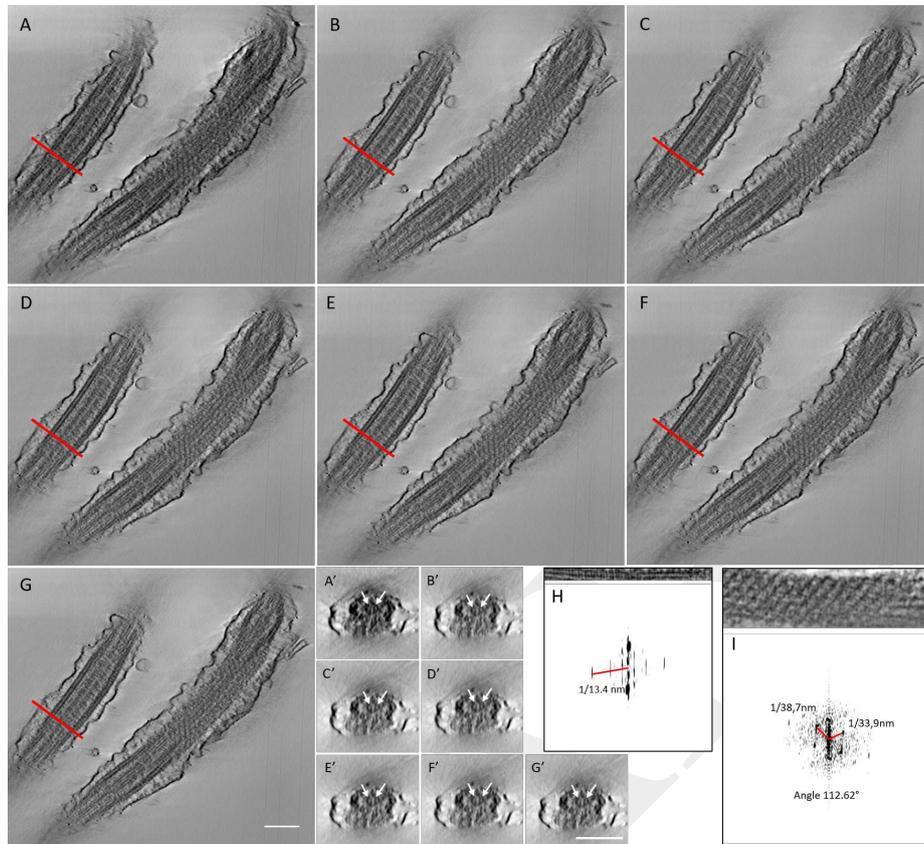


Figure 2: Plane XY (number 159) of the reconstruction of *Trypanosoma brucei* with different algorithms: patch-based approach with grid sampling (A) or local minima detection (B), SIFT (C), BRISK (D), AKAZE (E), KAZE (F), and ORB (G). A' to G' correspond to perpendicular slices of the reconstruction with the location displayed by a red line in the respective XY plane in A to G. White arrows point to the central doublet of the microtubules of the axoneme. Zoom of a central microtubule of the left cilia and its Fourier transform, displaying a structure with a 13.4 nm periodicity, corresponding to the central pair complex (CPC). Zoom of the left cilia in the region on the paraflagellar rod (PFR) and its Fourier transform (I), displaying the characteristic periodic structure. Scale bars represent 250 nm.

tained for each algorithm is shown in panels A to G. These planes highlight the left flagellum, with the presence of microtubules, and, more precisely, a periodic structure in the central pair complex of the axoneme. In the perpendicular section of the volume (Figures 2A' to G'), the microtubules are clearly visible, as well as the central pair complex (white arrows). Analysis of the Fourier transform of a side view of the central microtubule of the left cilia shows a structure with a 13.4 nm periodicity. This structure may correspond to the projection that extends toward the surrounding nine doublets already described in (Carbajal-González et al., 2013; Mitchell, 2003; Mitchell and Smith, 2009). This central pair complex (CPC) was reported to have a periodicity of 16 nm in cryo-conditions. Given the shrinkage that occurs in samples embedded in Epon of approximately 20% (Shah et al., 2015), this value appears to be correct.

Another structure visible in the right axoneme of Figure 2, the PFR, is a semi-crystalline structure involved in

the flagellar locomotion of *Trypanosoma brucei* (Koyfman et al., 2011). An analysis of the computed diffraction pattern of a single plane of the PFR of the left cilia (Figure 2I) shows diffraction spots expected for a crystal. The crystallographic unit cell lengths were measured to be $a = 38.7$ nm and $b = 33.9$, with an angle of 112.6° . Again, these values agree with those in the published study on the sample by cryo-microscopy, taking into account the shrinkage of samples embedded in Epon. In the XZ plane (Figure 3), the gold beads show no misalignment artifacts, except for the reconstructions using a patch-based approach initiated by grid or local minima detection (small deformation shown by the arrow).

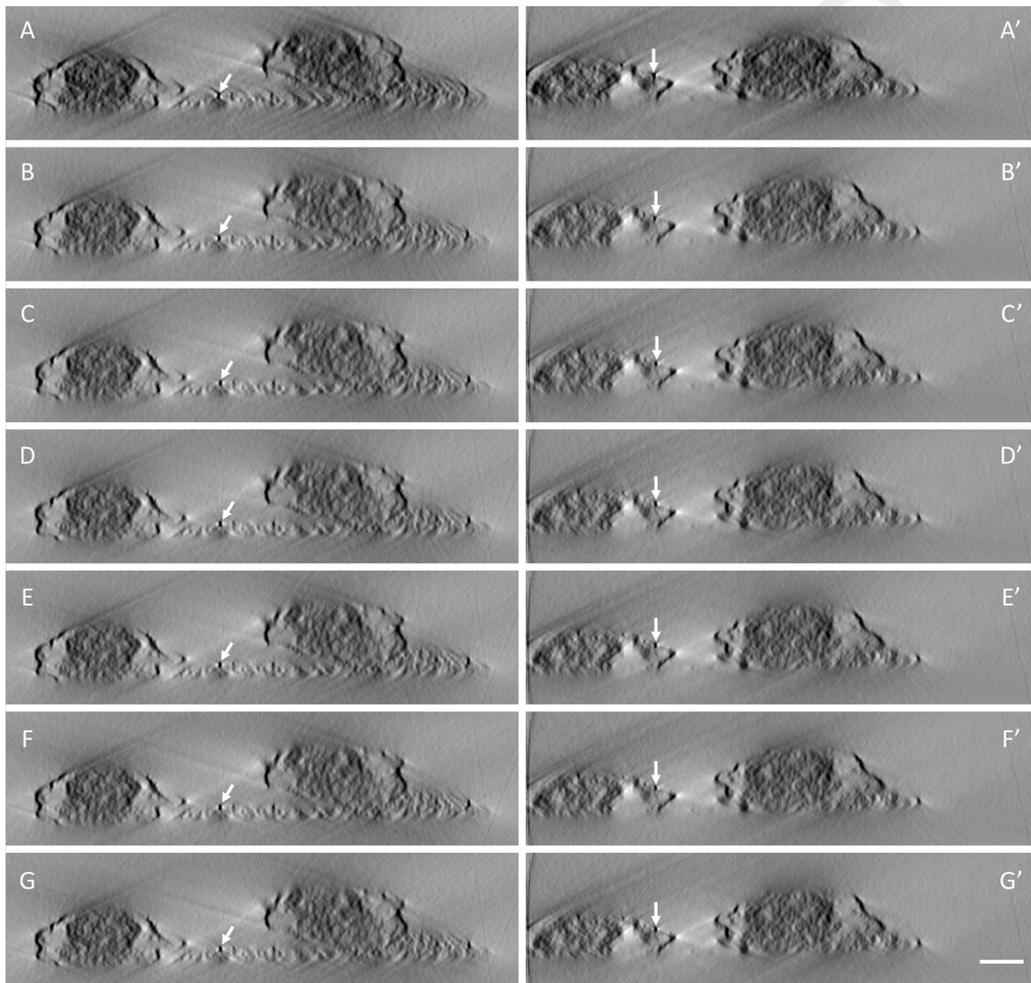


Figure 3: XZ Planes of *Trypanosoma brucei* reconstructions with different algorithms: patch-based approach with grid sampling (A and A'), or local minima detection (B and B'), SIFT (C and C'), KAZE (D and D'), AKAZE (E and E'), BRISK (F and F'), and ORB (G and G'). The XZ planes displayed are plane 486 for the left column and plane 678 for the right column. Arrows point to gold beads. The scale bar represents 250 nm.

In addition, we carried out supplementary tests to validate the robustness of the algorithms with respect to noise. First, we added the same Gaussian noise level to all images in the series. Several noise levels were tested

between 5% and 30% (Figure 4). All algorithms exhibited correct reconstructions for a noise level of up to 20%. A higher level of noise yielded reconstructions with alignment artifacts for SIFT and ORB. We then applied Gaussian noise at a random level to each image in the series. Two simulations were carried out with random values between 0 and 5% and between 0 and 10% (Figure 5). This test proved to be more difficult because the neighborhoods of detected features have different noise levels. This produces variability in the descriptor values. With this test, KAZE, AKAZE, and BRISK gave the best reconstructions. The large variability in the number of detected features between images using BRISK markedly increased the computation time. Moreover, the reconstruction obtained with BRISK required the removal of an image from the series because no point was detected in it. SIFT algorithms inefficiently produced chains with features for high-angle images. Thus, no reconstructions were obtained with variable noise between 0 and 10%. ORB provided reconstructions with alignment artifacts. This qualitative analysis of the reconstructions for each of the algorithms is summarized in Table 4.

	High level of gaussian noise	Random Gaussian noise	
		5	10
SIFT	20%	+	0
BRISK	30%	+++	+++
ORB	20%	++	++
KAZE	30%	+++	+++
AKAZE	30%	+++	+++

Table 4: Qualitative estimation of reconstructions obtained from the different detection algorithms as a function of the Gaussian noise added. Each algorithm was tested on a series with an added noise level ranging from 5 to 30%. The maximum noise value for which the reconstruction was qualitatively validated is indicated. Random Gaussian noise corresponds to the noise level added randomly between 0 and 5% or 0 and 10%. The symbols (+) represent the visual quality of the reconstructions for each of the algorithms used. The SIFT algorithm did not give results for the series obtained for Gaussian noise between 0 and 10%.

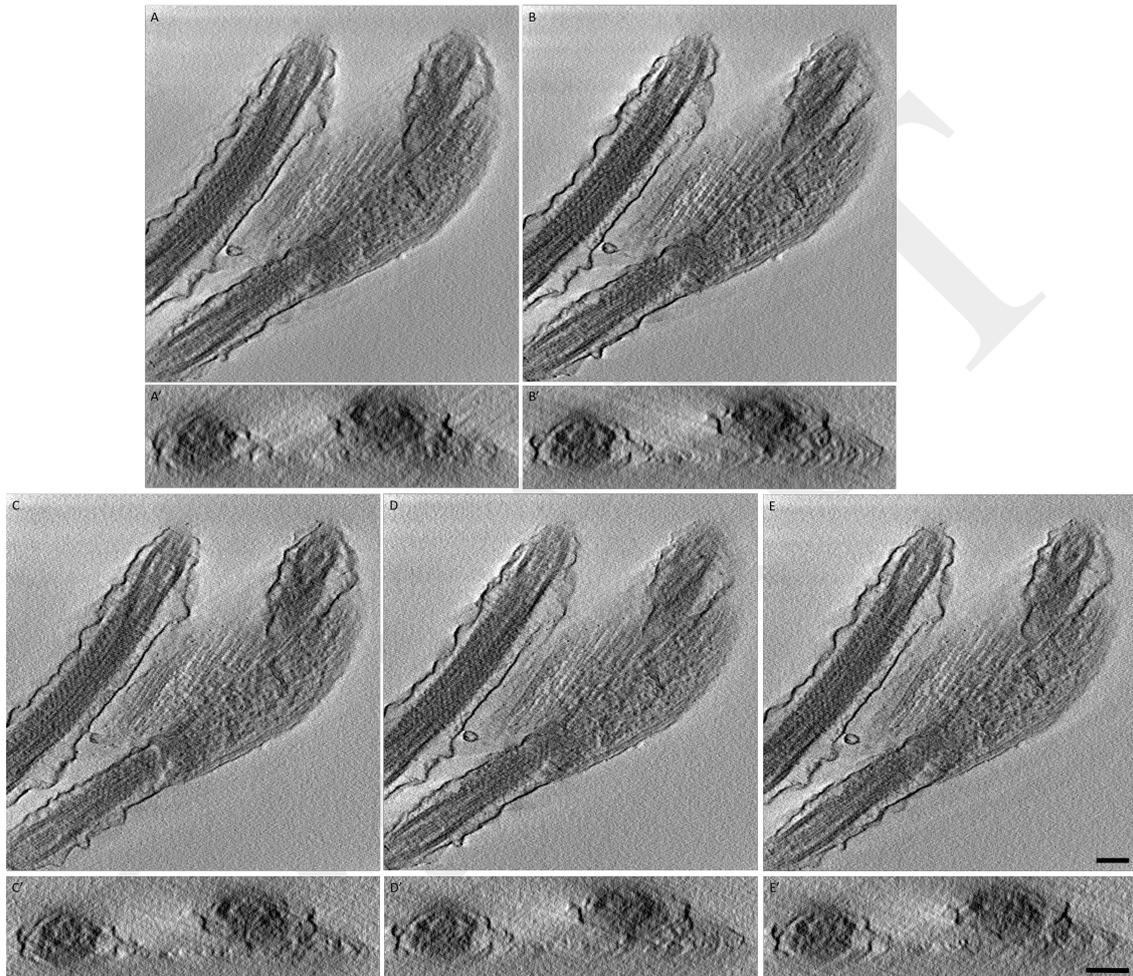


Figure 4: Reconstructions obtained using different detection algorithms, with different Gaussian noise levels applied consistently for all images in the same series. The images show the XY plane (A to E) and an XZ plane (A' to E') of the reconstructed volume of a sample of *Trypanosoma brucei* acquired in STEM. Qualitative reconstructions with a Gaussian noise of 20% in each image of a tilt series were possible for the SIFT (A) and ORB (B) detection algorithms. In addition, BRISK (C), KAZE (D), and AKAZE (E) were able to perform qualitative reconstructions with a Gaussian noise of 30% in each image of the tilt series. The scale bar represents 200 nm.

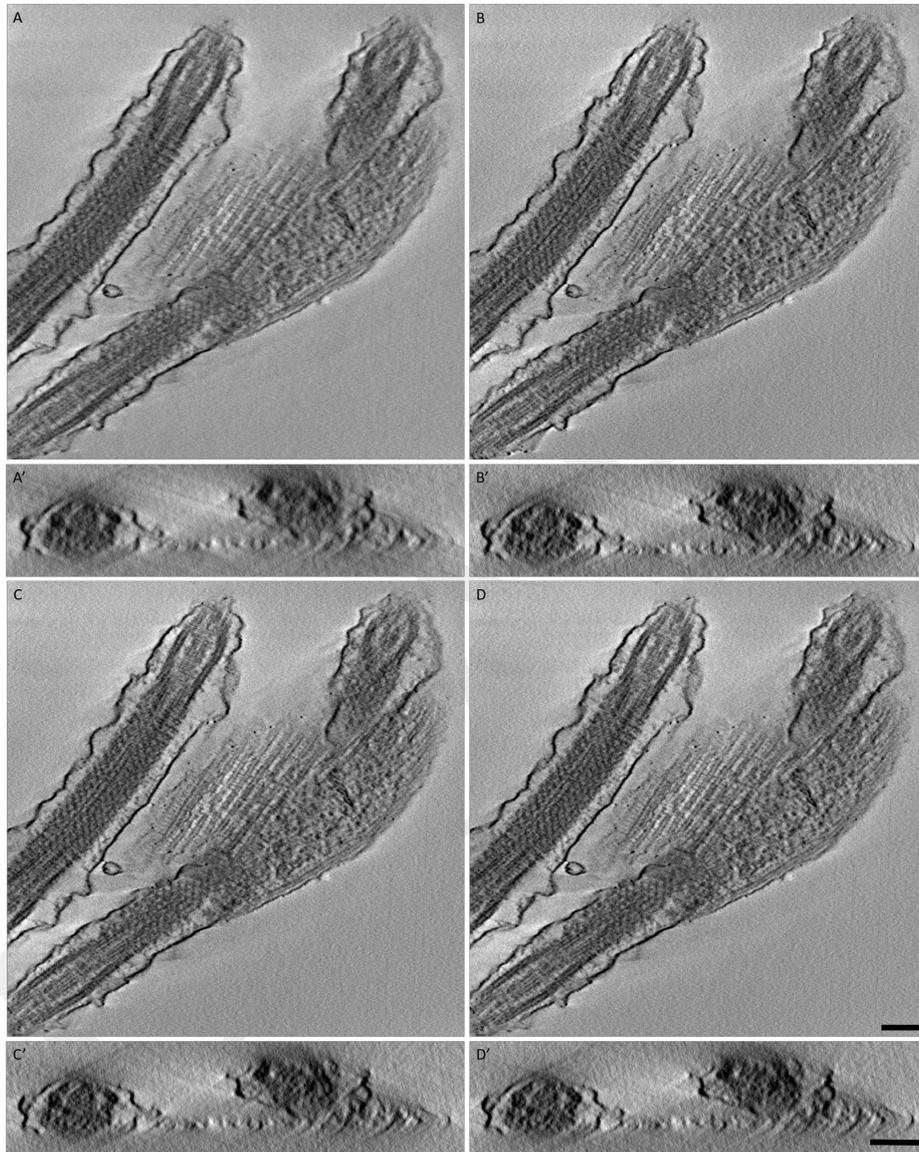


Figure 5: Reconstructions obtained using the different detection algorithms, with levels of Gaussian noise between 0 and 10%, applied randomly for each image in the series. The images show the XY plane (A to D) and an XZ plane (A' to D') of the reconstructed volume of *Trypanosoma brucei* acquired in STEM. A to D corresponds to results obtained with the ORB, BRISK, KAZE, and AKAZE algorithms respectively. SIFT is absent because it was impossible to detect points in several high-angle images. The scale bar represents 200 nm.

4. Discussion

The alignment of images from tomographic tilt series is crucial to compute accurate 3D reconstructions. Various approaches based on the identification of invariant features have been recently published and are suitable for performing image alignment. We evaluated their performance on the basis of reconstruction quality and computing time.

An advantage of such invariant feature-recognition methods to align tilt series is that they require no pre-alignment step, in contrast to patch-tracking approaches. The default parameters for the data used in the test, *i.e.* using full images, did not permit correct tracking for the patch tracking methods. Tuning of the pre-alignment was thus necessary for the data presented in this study and consisted of using only the central part of the images. Only the use of 70% of the full image gave a pre-alignment sufficient for patch tracking. The time needed for such tuning of the pre-alignment parameters was not considered in the comparison.

A comparison of the invariant features based on an analysis of Table 1 and Table 2 is summarized in Table 5. The SURF algorithm was clearly inadequate, as it had a lower good-match ratio than SIFT, whereas all other algorithms had a higher ratio. In addition, the speed-up of SURF was less beneficial than that of the algorithms using binary descriptors (BRISK, ORB). Thus, SURF was eliminated from further study. The ORB algorithm was less stable than the other algorithms for images with a very high tilt step (20°) versus a low tilt step (2°). However, ORB had a ratio of good matches at a low tilt step that was better than that of SIFT and a speed-up of 21 fold. Thus, this algorithm was retained for further analysis. The results obtained with KAZE showed a strong potential for non-linear filtering, as shown by the highest ratio of good matches with a low or high tilt step. This was countered, however, by the higher computation time than that required by the SIFT algorithm. We thus introduced AKAZE, an accelerated version of KAZE, in addition to KAZE, for further analysis. BRISK yielded better results than SIFT for the good match ratio and speed-up and was also retained for further analysis.

	Speed-up	Good match ratio	High tilt angle stability
BRISK	+++	++	++
KAZE	- -	+++	+++
ORB	+++	++	-
SIFT	+	+	+
SURF	++	-	- -

Table 5: Summary of compared criteria between the different algorithms in 2D. SIFT was used as the reference (+). The algorithms with a better score than SIFT are indicated by an additional “+”, whereas those with a lower score are indicated by “-”.

Once the best-performing algorithms were selected, the evaluation of their performance on full tomographic tilt-series required the design of an adapted workflow (detailed in the methods section). We decided to use brute-force matching to evaluate the intrinsic performance of each algorithm. With this approach, correct matching

does not depend on the sampling of matches, as with the other algorithms also available in OpenCV library. The computation cost is high and is not adapted to large numbers of features, *i.e.* more than 10,000 features per image. We observed that binary descriptors were of great interest in terms of computation time. Tuning the parameters of the detector parameters allowed us to adjust the number of features to a few thousand, which was sufficient to obtain correct alignments.

An optimization strategy to speed-up matching was proposed by (Han et al., 2014). The principle is to reduce the overall number of matching candidates by selecting only features located in a user-defined radius before match computation. This approach could be useful when the radius is small, meaning that the tilt series contains small shifts or drifts or was previously pre-aligned.

As our objective was to compare the intrinsic performance of each descriptor for electron tomography, we did not consider the optimization strategy proposed by Han *et al.* and coded a parallel computation to reduce the computing time. Such parallelization was performed by independently detecting features for each image (one thread per image) and matching sets of features from each image pair (one thread per image pair). The chaining of matches was not multi-threaded, as it takes only a few seconds to compute. Although the end-user of TomoJ can take advantage of such parallelization, we ran it using a single thread in order to compare the different algorithms, ignoring the possibly different degrees of parallelism introduced in each implementation.

All considered algorithms were able to produce a correct alignment and a correct 3D reconstruction. Nevertheless, BRISK and AKAZE proved to be the best alternatives to the SIFT and classical patch-tracking algorithms since they were faster and their alignment scores and percentages of good landmarks detected were amongst the best (Table 3). In addition, they are easily tunable, which is an advantage for end-users, because algorithms with few parameters are easy to understand. In terms of user-friendliness, BRISK is the most interesting, with three parameters, of which only one, the detection threshold, needs tuning. AKAZE is the second-best algorithm in terms of the number of adjustable parameters: five and again, a unique threshold, as with BRISK. In comparison, SIFT has five parameters, of which two are thresholds to tune. A third parameter to tune appears when using best-bin-first matching instead of the usual cross-validation method, as proposed in (Lowe, 2004). The graphical user interface provided in TomoJ previews the number of features detected in images to facilitate the tuning of parameters, thus helping to determine the optimal values before running the entire workflow. Tests of the stability of features found and alignments produced with respect to noise level showed KAZE and AKAZE to be the best alternatives to SIFT when confronted with very noisy data. BRISK proved to be able to deal with noisy data but the threshold parameter, common for all images, was difficult to tune when the noise varied between images, as it produced high variation in the number of features. The increased computation time needed for matching makes BRISK of little interest to the user. In general, with noisy data, such as cryo-samples, the algorithms require contrasted structures. The addition of high-contrast fiducial markers will be necessary when the noise is very high (acquisition without phase plate).

5. Conclusion

Algorithms based on feature detection and description are generally used in 2D image processing applied to object detection or panorama stitching. Han *et al.* (Han et al., 2014) proposed using SIFT, one such algorithm, to align images in electron tomography tilt series. Here, we compared other feature-detection algorithms to SIFT and classical approaches based on patch tracking as references for tomography tilt-series alignment. The algorithms tested were SIFT, KAZE, and AKAZE, which use nonlinear filtering, and BRISK and ORB, which are two binary descriptors. 2D analysis showed that feature detection and description was relevant for images with different tilt angles. Some (KAZE and BRISK) were even correct for the alignment of images with large differences in the tilt angle (20°). All approaches provided good alignment, with an average alignment error of close to one pixel. Based on the execution time and percentage of relevant features detected, we conclude that BRISK and the accelerated version of KAZE (AKAZE) are the best alternatives to SIFT. In case of noisy data, the best alternatives are KAZE and AKAZE. In addition, we propose a simple and unified workflow (feature detection, feature matching, chain creation and alignment) for all feature-based algorithms to facilitate the alignment of tilt series prior to reconstruction.

6. Acknowledgements

We thank Sylvain Trepout for the STEM dataset on the cilia of *Trypanosoma brucei* and help in the analysis of the reconstruction and critical reading of the manuscript. We thank COS Sorzano (CNB Spain) for the constructive exchanges at the beginning of the development of the project. We also thank Alexandre Becoulet for critical reading of the manuscript. A. Verguet is a recipient of an ANRT grant (CIFRE 2015 / 1489). This work was funded by the ANR (ANR-15-CE11-0002).

References

- Alcantarilla, P., Bartoli, A., Davison, A.J., 2012. KAZE Features. SpringerLink , 214–227doi:10.1007/978-3-642-33783-3_16.
- Alcantarilla, P., Nuevo, J., Bartoli, A., 2013. Fast explicit diffusion for accelerated features in nonlinear scale spaces, in: Proceedings of the British Machine Vision Conference, BMVA Press.
- Amat, F., Moussavi, F., Comolli, L.R., Elidan, G., Downing, K.H., Horowitz, M., 2008. Markov random field based automatic image alignment for electron tomography. *J. Struct. Biol.* 161, 260–275. doi:10.1016/j.jsb.2007.07.007.
- Audet, S., 2015. JavaCV. URL: <https://github.com/bytedeco/javacv>.
- Bay, H., Ess, A., Tuytelaars, T., Van Gool, L., 2008. Speeded-Up Robust Features (SURF). *Comput. Vision Image Understanding* 110, 346–359. doi:10.1016/j.cviu.2007.09.014.
- Beis, J.S., Lowe, D.G., 1997. Shape indexing using approximate nearest-neighbour search in high-dimensional spaces. *IEEE*. doi:10.1109/CVPR.1997.609451.
- Bradski, G., 2000. The OpenCV Library. *Dr. Dobb's Journal of Software Tools*.
- Brandt, S., Heikkonen, J., Engelhardt, P., 2001. Automatic Alignment of Transmission Electron Microscope Tilt Series without Fiducial Markers. *J. Struct. Biol.* 136, 201–213. doi:10.1006/jsbi.2001.4443.
- Brandt, S.S., Heikkonen, J., 2000. A fully automatic alignment of electron tomography images without fiducial markers, in: Proceedings of the IAPR Conference on Machine Vision Applications (IAPR MVA 2000), November 28-30, 2000, Tokyo, Japan, pp. 307–310. URL: <http://b2.cvl.iis.u-tokyo.ac.jp/mva/proceedings/CommemorativeDVD/2000/papers/2000307.pdf>.
- Buisson, J., Bastin, P., 2010. Flagellum Structure and Function in Trypanosomes. Springer Berlin Heidelberg. pp. 63–86. doi:10.1007/978-3-642-12863-9_3.
- Calonder, M., Lepetit, V., Strecha, C., Fua, P., 2010. BRIEF: Binary Robust Independent Elementary Features. SpringerLink , 778–792doi:10.1007/978-3-642-15561-1_56.
- Carbajal-González, B.I., Heuser, T., Fu, X., Lin, J., Smith, B.W., Mitchell, D.R., Nicastro, D., 2013. Conserved structural motifs in the central pair complex of eukaryotic flagella. *Cytoskeleton* 70, 101–120. doi:10.1002/cm.21094.
- Castaño-Díez, D., Scheffer, M., Al-Amoudi, A., Frangakis, A.S., 2010. Alignator: A GPU powered software package for robust fiducial-less alignment of cryo tilt-series. *J. Struct. Biol.* 170, 117–126. doi:10.1016/j.jsb.2010.01.014.

- Fischler, M.A., Bolles, R.C., 1981. Random sample consensus: a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Commun. ACM* 24, 381–395. doi:10.1145/358669.358692.
- Frank, J., McEwen, B.F., 1992. Alignment by Cross-Correlation. *SpringerLink* , 205–213doi:10.1007/978-1-4757-2163-8_9.
- Han, R., Zhang, F., Wan, X., Fernández, J.J., Sun, F., Liu, Z., 2014. A marker-free automatic alignment method based on scale-invariant features. *J. Struct. Biol.* 186, 167–180. doi:10.1016/j.jsb.2014.02.011.
- Huang, H., Lu, L., Yan, B., Chen, J., 2010. A new scale invariant feature detector and modified SURF descriptor. *2010 Sixth International Conference on Natural Computation* 7, 3734–3738. doi:10.1109/ICNC.2010.5583377.
- Kovtun, O., Leneva, N., Bykov, Y.S., Ariotti, N., Teasdale, R.D., Schaffer, M., Engel, B.D., Owen, David.J., Briggs, J.A.G., Collins, B.M., 2018. Structure of the membrane-assembled retromer coat determined by cryo-electron tomography. *Nature* 561, 561–564. doi:10.1038/s41586-018-0526-z.
- Koyfman, A.Y., Schmid, M.F., Gheiratmand, L., Fu, C.J., Khant, H.A., Huang, D., He, C.Y., Chiu, W., 2011. Structure of *Trypanosoma brucei* flagellum accounts for its bihelical motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11105–11108. doi:10.1073/pnas.1103634108.
- Leutenegger, S., Chli, M., Siewert, R.Y., 2011. BRISK: Binary Robust invariant scalable keypoints. *2011 International Conference on Computer Vision* , 2548–2555doi:10.1109/ICCV.2011.6126542.
- Lowe, D.G., 2004. Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *Int. J. Comput. Vision* 60, 91–110. doi:10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94.
- Mair, E., Hager, G.D., Burschka, D., Suppa, M., Hirzinger, G., 2010. Adaptive and Generic Corner Detection Based on the Accelerated Segment Test. *SpringerLink* , 183–196doi:10.1007/978-3-642-15552-9_14.
- Mastrorade, D.N., 2007. Fiducial Marker and Hybrid Alignment Methods for Single- and Double-axis Tomography. *SpringerLink* , 163–185doi:10.1007/978-0-387-69008-7_6.
- Mastrorade, D.N., Held, S.R., 2017. Automated tilt series alignment and tomographic reconstruction in IMOD. *J. Struct. Biol.* 197, 102–113. doi:10.1016/j.jsb.2016.07.011.
- Mattei, S., Tan, A., Glass, B., Müller, B., Kräusslich, H.G., Briggs, J.A.G., 2018. High-resolution structures of HIV-1 Gag cleavage mutants determine structural switch for virus maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E9401–E9410. doi:10.1073/pnas.1811237115.

- Messaoudi, C., 2011. TomoJ. URL: <https://sourceforge.net/projects/tomoj>. [Online; accessed 27. Nov. 2018].
- Messaoudi, C., Boudier, T., Sorzano, C.O.S., Marco, S., 2007. TomoJ: tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. *BMC Bioinf.* 8, 288. doi:10.1186/1471-2105-8-288.
- Miksik, O., Mikolajczyk, K., 2012. Evaluation of local detectors and descriptors for fast feature matching. *Proceedings of the 21st International Conference on Pattern Recognition (ICPR2012)*, 2681–2684 URL: <https://ieeexplore.ieee.org/document/6460718>.
- Mitchell, D.R., 2003. Orientation of the central pair complex during flagellar bend formation in *Chlamydomonas*. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 56, 120–129. doi:10.1002/cm.10142.
- Mitchell, D.R., Smith, B., 2009. Chapter 13 - Analysis of the Central Pair Microtubule Complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods in Cell Biology* 92, 197–213. doi:10.1016/S0091-679X(08)92013-6.
- Rosten, E., Drummond, T., 2006. Machine Learning for High-Speed Corner Detection. *SpringerLink*, 430–443 doi:10.1007/11744023_34.
- Rublee, E., Rabaud, V., Konolige, K., Bradski, G., 2011. ORB: An efficient alternative to SIFT or SURF. *2011 International Conference on Computer Vision*, 2564–2571 doi:10.1109/ICCV.2011.6126544.
- Saxton, W.O., Baumeister, W., Hahn, M., 1984. Three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals. *Ultramicroscopy* 13, 57–70. doi:10.1016/0304-3991(84)90057-3.
- Shah, F.A., Johansson, B.R., Thomsen, P., Palmquist, A., 2015. Ultrastructural evaluation of shrinkage artefacts induced by fixatives and embedding resins on osteocyte processes and pericellular space dimensions. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 103, 1565–1576. doi:10.1002/jbm.a.35287.
- Sorzano, C.O.S., Messaoudi, C., Eibauer, M., Bilbao-Castro, J., Hegerl, R., Nickell, S., Marco, S., Carazo, J., 2009. Marker-free image registration of electron tomography tilt-series. *BMC Bioinf.* 10, 124. doi:10.1186/1471-2105-10-124.
- Trépout, S., Tassin, A.M., Marco, S., Bastin, P., 2018. STEM tomography analysis of the trypanosome transition zone. *J. Struct. Biol.* 202, 51–60. doi:10.1016/j.jsb.2017.12.005.
- Wang, G., Jiang, M., 2004. Ordered-subset simultaneous algebraic reconstruction techniques (OS-SART). *J. X-Ray Sci. Technol.* 12, 169–177. URL: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-x-ray-science-and-technology/xst00110>.

Weickert, J., Romeny, B.M.T.H., Viergever, M.A., 1998. Efficient and reliable schemes for nonlinear diffusion filtering. *IEEE Trans. Image Process.* 7, 398–410. doi:10.1109/83.661190.

Winkler, H., Taylor, K.A., 2006. Accurate marker-free alignment with simultaneous geometry determination and reconstruction of tilt series in electron tomography. *Ultramicroscopy* 106, 240–254. doi:10.1016/j.ultramic.2005.07.007.

DRAFT

Supplementary

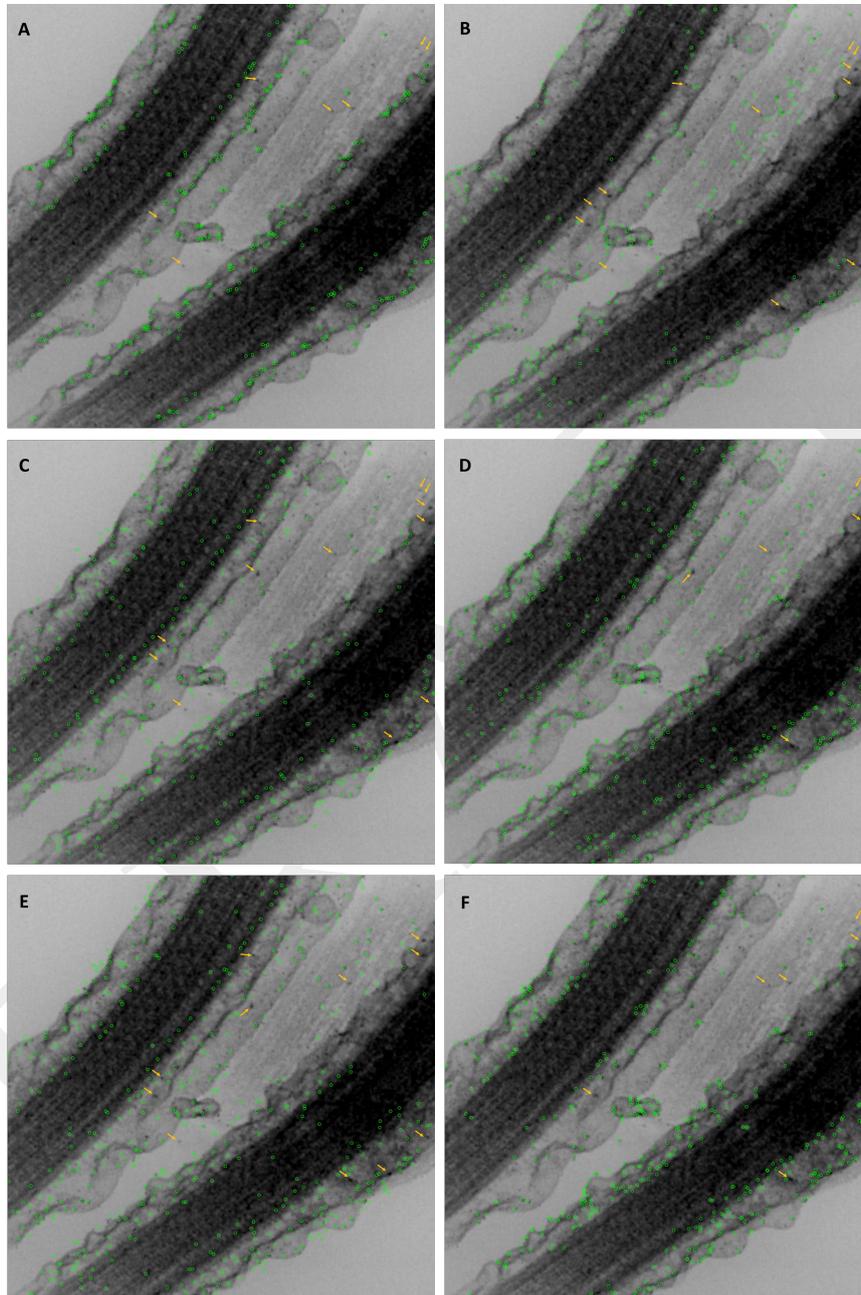


Figure S1: Zoomed image at tilt angle 0° from *Trypanosoma brucei* tilt series. The green circles corresponds to the features detected with different algorithms: Patch based approach with local minima detection (A), SIFT (B) and KAZE (C), BRISK (D), AKAZE (E) and ORB (F). Arrows point to gold beads not detected by algorithm. Scale bar represents 200 nm.

Annexe C

Chapitre 4

Article - An ImageJ tool for simplified post-treatment of TEM phase contrast images

An ImageJ tool for Simplified post-treatment of TEM Phase Contrast Images (SPCI)

Verguet Amandine, Messaoudi Cédric, Marco Sergio et Donnadiou Patricia.

Publié le 28 mars 2019

Parue dans la revue *Micron* <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.01.006>

Plugin SPCI <http://www.cmib.fr/fr/telechargements/software/SPCI.html>

Sources <https://github.com/averguet/spci.git>



Short communication

An ImageJ tool for simplified post-treatment of TEM phase contrast images (SPCI)

Verguet Amandine^{a,b,c,*}, Messaoudi Cédric^{b,c}, Marco Sergio^{b,c,d}, Donnadiou Patricia^e^a JEOL (Europe) SAS, allée de Giverny, F-78290 Croissy-sur-Seine, France^b Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR9187, F-91405 Orsay, France^c Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, INSERM U1196, F-91405 Orsay, France^d Sanofi Pasteur, avenue Marcel Merieux, F-69280 Marcy L'Etoile, France^e Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, SIMaP, F-38000 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Image processing
Phase-contrast
Phase image
TEM image
ImageJ plugin

ABSTRACT

Tools for taking advantage of phase-contrast in transmission electron microscopy are of great interest for both biological and material sciences studies as shown by the recent use of phase plates and the development of holography. Nevertheless, these tools most often require highly qualified experts and access to advanced equipment that can only be considered after preliminary investigations. Here we propose to address this issue by the development of an ImageJ plugin that allow the retrieval of a phase image by simple numerical treatment applied to two defocused images. This treatment based on Tikhonov regularization requires the adjustment of a single parameter. Moreover, it is possible to use this approach on one-image. Although in that case the retrieved image gives only qualitative information, it is able to enhance the image contrast appropriately. This can be of interest for specimens producing low contrast images under the electron microscopes, such as some frozen hydrated biological samples or those sensible to electron radiation unsuitable for holographic studies.

1. Introduction

Characterization of nanometric objects is becoming crucial to address environmental and technological problems in biology (*i.e.*, asbestos contamination, nano-particle toxicity, vaccine adjuvants) and material sciences (*i.e.*, catalyst efficiency, compaction and material properties enhancement). Because Transmission Electron Microscopy (TEM) has high spatial resolution, it is the method of choice to address these issues. However, due to their size and low average atomic number some objects give rise to a low contrast impeding their differentiation from the background. With appropriate focusing of the objective lens, this so-called phase-contrast makes possible to highlight objects borders and structures otherwise invisible. Therefore, application of phase-contrast on nanometric objects can facilitate their study because it became easier to recognize them on a background. There is a drawback though, as on the phase-contrast image the object contour and thus the size change with the focusing of the objective lens. More generally, a phase-contrast image displays a partial view of the object.

The formation of phase-contrast image is accounted by the contrast transfer function (CTF) of the microscope, which acts as a spatial filter depending, among other parameters, on the focusing of the objective

lens. As a result, the phase-contrast images recorded at a certain focus is built only with a part of all the spatial frequencies, thus making some structures undetectable. Therefore, to obtain a fully reliable image of the object it is required to combine the information coming from phase-contrast images acquired at different defocus values. It has been demonstrated by Schiske (Schiske, 2002) that it is possible to retrieve from a TEM focal series a phase image that stands as a reconstruction of the object. The accuracy of this reconstruction depends on the focus step: a series taken with a smaller focus step leads to a higher accuracy but implies larger number of recorded images. More recently, Van Dyck *et al.* (1996) and O'Keefe *et al.* (2001) have shown that quantitative phase image, at full resolution by focal series reconstruction, requires a large set of experimental images. However, such a requirement increases the risk to induce damages on the sample. Because, the total electron dose received by the specimen is proportional to the number of recorded images, the advantage of phase image reconstruction for samples sensible to high electron doses is limited. This is the case of frozen hydrated samples in biology that require electron dose lower than $15e^-/\text{Å}^2$ (Karuppasamy *et al.*, 2011). Additionally, the combination of images acquired at different focus to perform a phase image reconstruction needs sophisticated algorithms including several

* Corresponding author. Institut Curie, Bat 112, Campus Universitaire, 91045 Orsay cedex, France
E-mail address: amandine.verguet@ssji.net (V. Amandine).

<https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.01.006>

Received 28 November 2018; Received in revised form 18 January 2019; Accepted 18 January 2019

Available online 28 March 2019

0968-4328/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

corrections of misalignment and distortion (Koch, 2014) as well as a non-trivial adjustment of parameters, limiting the use of phase image reconstruction.

To fully appreciate the benefits of phase image reconstruction the development of a user-friendly method able to retrieve a phase image from a limited number of phase-contrast images is needed. Based on a method requiring two defocused images and a simple numerical treatment (Donnadieu et al., 2008), we have implemented a plugin able to perform a quantitative phase-contrast reconstruction in the widely used image processing software ImageJ (Schneider et al., 2012). Moreover, we have adapted this approach to compute a qualitative phase image reconstruction enhancing borders and structures by using only one-image. The method requires only basic knowledge of TEM image formation and standard TEM equipment operated by a TEM user.

2. Tikhonov solution for simple phase retrieval from two phase-contrast images

2.1. Background

In TEM imaging, phase-contrast is a weak contrast that arises from the phase shift of the electron wave traversing the sample. When the sample is very thin or non-crystalline or constituted of light atoms, diffraction and absorption effects being small, phase-contrast is currently the more relevant for image formation. As phase-contrast is sensitive to very fine scale details, phase imaging is in principle the most appropriate to give high resolution information. However, a TEM image does not display a phase image but the result of the transfer of the exit electron wave by the electron optics. In the phase object approximation, this can be conveniently written in the reciprocal space as follows:

$$\hat{I}(q, \Delta z) = I_0(1 - 2\hat{\Phi}(q)\sin(\pi\lambda\Delta zq^2 + \frac{Cs}{2}\lambda^3q^4)) \quad (1)$$

where $\hat{I}(q)$ and $\hat{\Phi}(q)$ are respectively correspond to the Fourier Transform (FT) of $I(r)$, the intensity, and $\Phi(r)$, the phase function; I_0 , the intensity of the incident wave; λ , the electron wave length; Δz , the objective lens defocus; Cs , the objective lens spherical aberration coefficient.

It is worth noting that the phase function $\Phi(r)$ represents the object (with the only bias of the projection effect), while the image $I(r)$ is modified by a CTF that depends on the imaging conditions, *i.e.* the electron wavelength and the objective lens characteristics (aberration coefficients, Δz). As proposed by Schiske (2002), the phase can be restored using a series of TEM images taken at different defocus. When the aim is to achieve a high resolution reconstruction, a large number of images and small defocus step are required. But if a limited resolution can be sufficient (for instance a resolution not better than 1 nm *i.e.* $q < 1 \text{ nm}^{-1}$), the high order term can be neglected in relation that then writes as:

$$\hat{I}(q, \Delta z) = I_0(1 - 2\hat{\Phi}(q)\sin(\pi\lambda\Delta zq^2)) \quad (2)$$

As far as the term $\pi\lambda\Delta zq^2$ is small (*i.e.* ≈ 0.5), the sinus function can be approximated by its argument, relation (2) writes then as:

$$\hat{I}(q, \Delta z) = I_0(1 - 2\hat{\Phi}(q)\pi\lambda\Delta zq^2) \quad (3)$$

At this step, it should be noted that the previous approximation determines the resolution of the method since the condition $\pi\lambda\Delta zq^2 < 0.5$ corresponds in direct space, to dimensions larger than $\sqrt{2\pi\lambda\Delta z}$. As a consequence, the resolution of this simplified method depends on the experimental conditions, *i.e.* the wave length and the focus Δz . For example, at 200 keV, a focus $\Delta z = +50 \text{ nm}$ will give a phase image with a resolution limited to 1 nm by the method.

This simplified relation can be applied to two images recorded at $+\Delta z$ and $-\Delta z$ to derive a relation between the FT of the phase function $\hat{\Phi}(q)$ and $\Delta\hat{I}(q) = \hat{I}(q, +\Delta z) - \hat{I}(q, -\Delta z)$ the FT of the difference

between these two images:

$$\hat{\Phi}(q) = -\frac{1}{I_0} \frac{1}{4\pi\lambda q^2} \frac{\Delta\hat{I}(q)}{\Delta z} \quad (4)$$

This relation has been here obtained using a CTF. However it has been also demonstrated from a more general point of view using a Transport Intensity Equation (TIE) (Paganin and Nugent, 1998) (Paganin and Nugent, 1998; Ishizuka and Allman, 2005). The advantage of the CTF approach is to be more familiar to TEM users.

It is worth noting that, instead of considering two images recorded at $+\Delta z$ and $-\Delta z$, following the relation (3), the phase could also have been simply derived from the image at zero focus and the image at focus Δz . In that case the phase is given by the following relation:

$$\hat{\Phi}(q) = -\frac{1}{I_0} \frac{1}{2\pi\lambda q^2} \frac{\Delta_0\hat{I}(q)}{\Delta z} \quad (5)$$

where $\Delta_0\hat{I}(q) = \hat{I}(q, \Delta z) - \hat{I}(q, 0)$ is the difference between the FT of the image recorded at focus Δz and the one at zero focus. Therefore, depending on the images available, either a numerical treatment based on one TEM image and or a two-image treatments based on a focal series of two TEM images can be carried out. It has been done above using the CTF approach but can also be obtained with the TIE one. The respective advantages and limits of both treatments will be considered in the following.

2.2. Tikhonov regularization and the SPCI image treatments

The main issue to retrieve the phase function $\Phi(r)$ using relation (5) is to deal with the singularity in $q = 0$ arising from the function $1/q^2$. This difficulty, typical with inverse problems, can be solved using a Tikhonov regularization as proposed by Mitome et al. (2010). It means replacing the $1/q^2$ function by a function $T(q) = q^2/(q^2 + a^2)^2$. For $q \gg a$, $T(q)$ is close to $1/q^2$ while for $q = 0$ and its vicinity, they strongly differ since $T(q)$ tends to 0 for $q = 0$ and is maximum for $q = a$.

The wave vector $q = 0$ and its vicinity correspond to low spatial frequencies domain in reciprocal space, *i.e.* long-scale fluctuations in direct space that are often due to meaningless contrast fluctuations. Therefore, depending on the scale of details of interest and of the meaningless information with respect to the region of interest, the impact of the regularization is variable. The above Tikhonov regularization provides a simple solution but one will have to be careful in the choice of the parameter a -value.

The strong point of this regularization method is to involve only one parameter. In general, the length scale of interest of a system is known, therefore making the appropriate choice should be easy. As illustrated in Fig. 1, in the vicinity of $q = 0$ the information will be cancelled out while for $q = a$, the Tikhonov function is maximum. This means that depending on the wave length of significant details with respect to this maximum, they might be cancelled out or rather amplified. In other words, it is extremely important to have in mind the characteristic wave length (either for the meaningful and meaningless details) to make a correct choice.

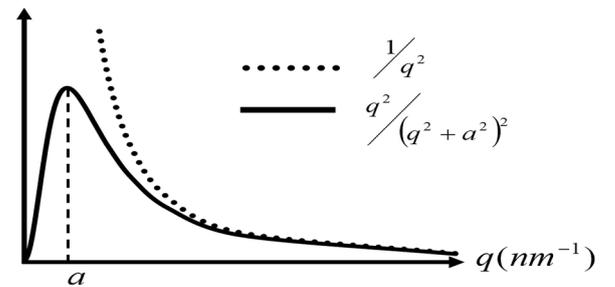


Fig. 1. Graphical representation comparing the function $1/q^2$ and a Tikhonov function $T(q) = q^2/(q^2 + a^2)^2$.

The simplified approach described by relation (4) after implementation of the above Tikhonov regularization then consists in retrieving the phase image using the following relation:

$$\hat{\Phi}(q) = -\frac{1}{I_0} \frac{1}{4\pi\lambda} \frac{q^2}{(q^2 + a^2)^2} \frac{\Delta\hat{I}(q)}{\Delta z} \quad (6)$$

At first it requires the acquisition of two images at focus $-\Delta z$ and $+\Delta z$. In the relation (6), I_0 stands for the intensity of the incident wave. In case of a weak phase object, I_0 is given by the image at zero focus, *i.e.* the zero-contrast image. However, if it can be assumed that the $I(+\Delta z)$ and $I(-\Delta z)$ images are showing phase-contrast, I_0 can be estimated from their background which has the advantage to limit the number of required images to two ($I(+\Delta z)$ and $I(-\Delta z)$). Considering this approximation in addition to the ones done on relation (3) (Section 2.1) allows to further simplify our approach of phase retrieval, referred to Simplified Phase Contrast Images (SPCI).

It should be noted that the same approximation on the zero-focus image can be applied to relation (5). The phase can be retrieved using only a single experimental image, *i.e.* a defocused image. In the following we will refer to two-images SPCI treatment when two images $I(+\Delta z)$ and $I(-\Delta z)$ are used, and to one-image SPCI treatment when only a defocused image is used; in both cases the zero-defocus image will be replaced by a constant background intensity image.

As the phase retrieval based on the Tikhonov regularization can be described as a filter in reciprocal space, the spatial frequencies being transferred according to the function $T(q)$, the numerical treatment can be seen as a simple image processing that can be achieved by many software. The processing will involve the experimental defocused images (either one or two if the one-image or two-images treatment is chosen, respectively) and two images build by the operator, *i.e.* the constant intensity image that will stand for the zero-focus image and an image in reciprocal space representing the Tikhonov function $T(q)$. In the present case, as described in the next section, it was chosen to write a plugin for the software ImageJ (Schneider et al., 2012).

Because of the image subtraction involved in the processing, the images $I(+\Delta z)$ and $I(-\Delta z)$ have to be properly aligned. Shift correction can be done using a plugin already available for ImageJ (Schneider et al., 2012) such as TomoJ software (Messaoudi, 2011). Also because of the focus difference, the images $I(+\Delta z)$ and $I(-\Delta z)$ may have slightly different magnification. This can occur for high focus, in such case a re-scaling should be done directly with ImageJ software. When needed, image alignment and re-scaling should be done as a pre-treatment before retrieving the phase image.

Finally, it is worth noting that the output of the calculation is in radian, that providing the reciprocal scaling factor has been taken into account. For a N pixel ROI and a pixel size p in direct space, the pixel size in the reciprocal space is $1/Np$. Therefore, a multiplication by a factor N^2p^2 arises when the numerical calculation of the Tikhonov regularization function is done in reciprocal space pixel.

In this section we describe the implementation of the ImageJ plugin and its evaluation with gold nano-particle, trypanosome resin embedded and frozen hydrated bacteria as examples for material science and biological applications.

3. SPCI plugin: Workflow conception and interface

The algorithm behind SPCI plugin is composed of 3 major steps (Fig. 2). In the first step two aligned defocused images (Fig. 2A and B) are selected by the user. Some parameters, related to the microscope and described below, are then requested (Fig. 2C). In order to compute the phase image (Fig. 2F), an image of the Tikhonov parameter a -value (Fig. 2E) is generated to filter the result of the FT. Another image (Fig. 2D) is obtained from the subtraction of the two aligned defocused images, which result is divided by a background image or a zero contrast image. This step is explained in the previous section uses a

background value or an image as I_0 . The second step consists in taking the FT of the difference between the two defocused images (FT) and to multiply by the Tikhonov regularization (5), *i.e.* a computed image based on the function $q^2/(q^2 + a^2)^2$ with q in pixel. The last step consists in computing the inverse FT (FT^{-1}) to obtain the phase map in direct space (Fig. 2F).

Experimental conditions (focus value, voltage or electron wavelength, pixel size) are provided by the user as well as background value from the selected focus images and the Tikhonov parameter. It should be noted that the user interface (Fig. 3) will require a -value in pixel (a) that will be transformed in reciprocal space units using the pixel size parameters and will be displayed in the interface window.

SPCI plugin has been developed in JAVA to be easily used with ImageJ (Schneider et al., 2012). ImageJ is a widely used tool for image processing and analysis. As Parallel colt JAVA library (Wendykier and Nagy, 2010) offers a better implementation of the FT than ImageJ, this library is used by SPCI. To warranty correct computation of contrast image it is required that the pixel (over and under-focused images) corresponds to equivalent positions on the sample. Indeed, phase-corrected image is calculated pixel per pixel by applying equations described in Section 2 and therefore for each image (over and under-focus) pixels might be aligned. TomoJ (Messaoudi et al., 2007) provides already plugins with robust algorithms for this purpose and there is also other plugin dedicated to the alignment, such as TurboReg (Thevenaz et al., 1998) and Template Matching and Slice Alignment (Tseng, 2018). We decided to not include this step in SPCI plugin.

SPCI plugin user interface starts by the selection of only two focused images ($+\Delta$ and $-\Delta$ symmetric with respect to zero focus) in input as well as the absolute value of their defocused, electron wavelength, and pixel size is required. It is also possible to include only one image and therefore only a qualitative approach will be applied. As described above, the interface offers the possibility to choose how the background is determined. This value or image will be used as I_0 in the equation. The interface require a Tikhonov a -value in pixel. Its equivalence in nm^{-1} is dynamically displayed. To help user to determine the appropriate a -value, the plugin offers to compute the phase image for several Tikhonov parameter or a -value in one run: the number of a variations and the multiplying factor between each variation are chosen by the user. For instance, for the above choice (Fig. 3), the user obtains 3 images with a -values of 10, 100, 1000 pixels.

4. Application of SPCI plugin to experimental data

4.1. Experimental details

To evaluate the capabilities of SPCI plugin for material science and biological applications, we have used gold nano-particles with size ranging between 1 and 5 nm deposited on carbon coated grid and *Trypanosoma brucei* semi-thin (200–300 nm) epon embedded section as well as frozen hydrated *Escherichia coli* K12 sample. TEM observations for gold nano-particle were carried out on a FEI Titan 80–300 with probe and image aberration corrector operated at 300 kV. No objective aperture was used for the TEM image formation. Brightness was adjusted to obtain a good signal-to-noise ratio and a short exposure time to avoid drift during image acquisition. Focal series were recorded on a Gatan slow scan CCD camera, at $185,000\times$ magnification with defocus range from -200 to 200 nm and 20 nm defocus step between images. The zero-focus objective lens current was estimated as accurately as possible from the absence of contrast of the carbon supporting film.

Regarding biological samples, *T. brucei* was prepared as described in Trépout et al. (2018). In the case of frozen hydrated specimen, *E. coli* at initial stationary phase was diluted with LB culture medium. An aliquot of $5\mu\text{l}$ was deposited on a 200 mesh copper lacey carbon grid and then frozen in liquid ethane at -178°C by using Leica EM CPC and transferred to a JEOL Electron Microscope JEM-2200FS by using Gatan 626 high-tilt cryo-holder. Images were acquired at 200 kV using a $100\mu\text{m}$

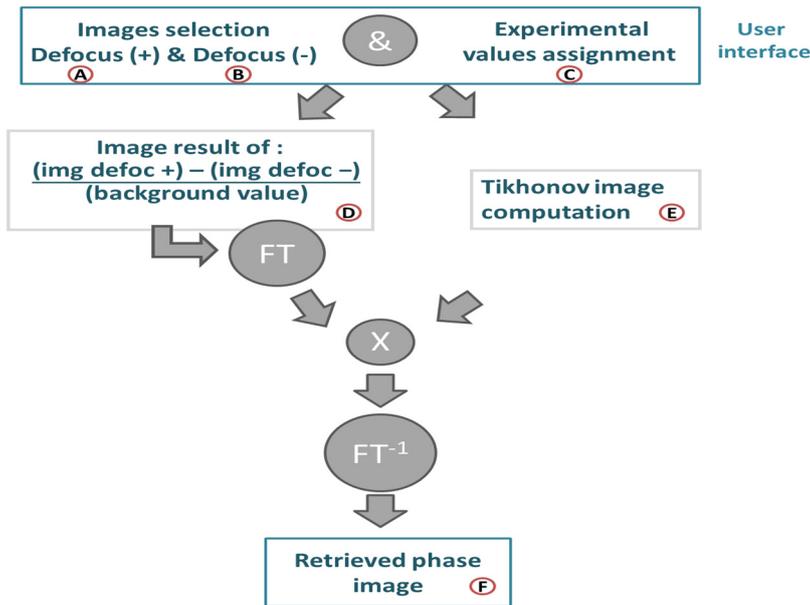


Fig. 2. SPCI workflow, the major steps of the algorithm are illustrated. A, B, C are selected in the interface by the user. The intermediate image D extracts information from the focus images. E is the image of the Tikhonov parameter. F is the phase image obtained at the end of the process. img, image; FT, Fourier Transform; FT^{-1} , Fourier Transform inverse.

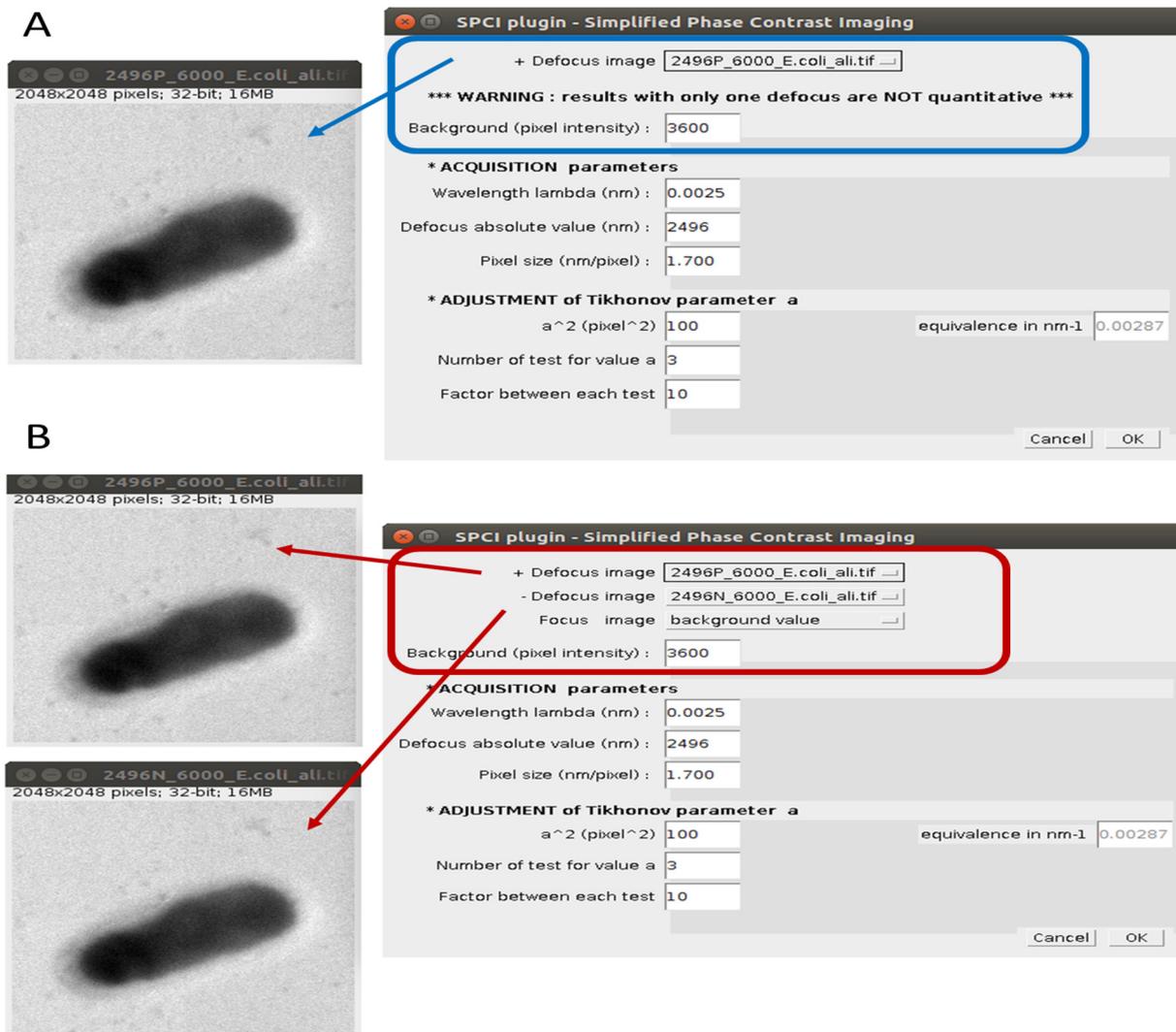


Fig. 3. Screenshot of the two possible user interfaces of SPCI plugin. In the first interface, a warning message notifies the user that the treatment with one-image is not quantitative. The one-image SPCI treatment is still possible from the multiple-image interface by selecting “background value” in the choice of second defocus image.

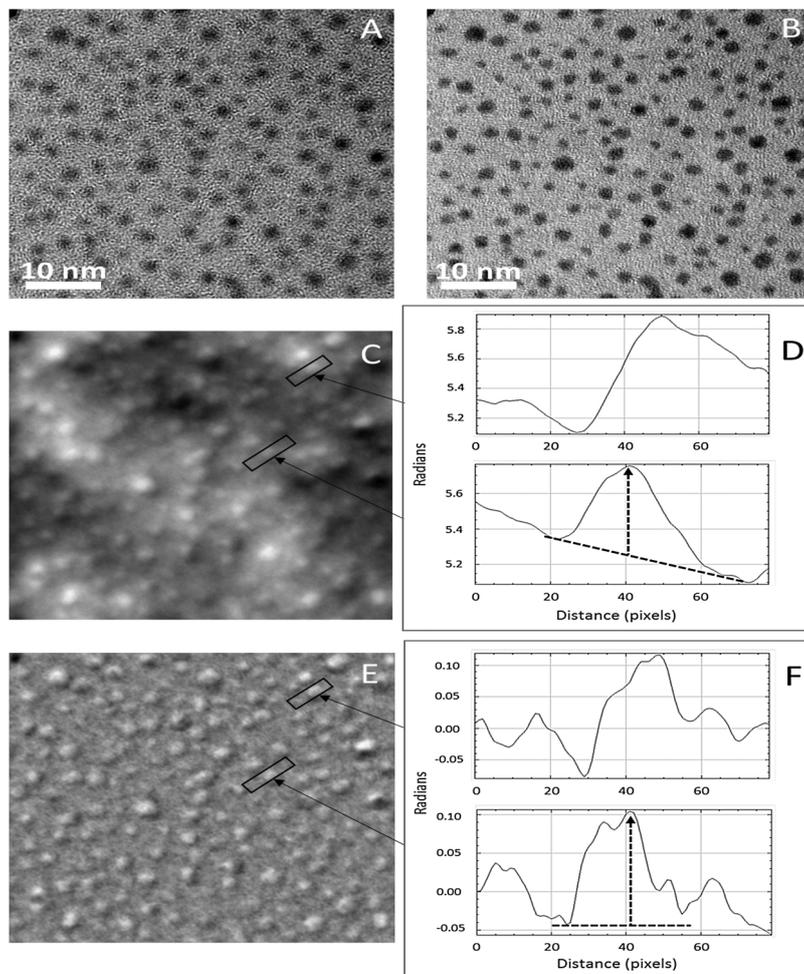


Fig. 4. Two-image SPCI treatment applied to gold nano-particle. A and B correspond to +40 nm and -40 nm defocus images, respectively. C and E are the phase image resulting from two-images SPCI treatments for Tikhonov value of $a = 1$ pixel and 10 pixels (corresponding in the image acquisition conditions to $a = 0.02 \text{ nm}^{-1}$ and $a = 0.2 \text{ nm}^{-1}$). Respectively, graphics D and F show the intensity profiles of the gold particles in the region of interest pointed by arrows on images C and E. As pointed by the dotted arrows, depending on the a -parameter, the measured phase values are respectively about 0.5 rad for $a = 1$ pixel (0.02 nm^{-1}) and about 0.1 rad for $a = 10$ pixels (0.2 nm^{-1}).

condenser aperture (CLA2). Acquisition was performed at a magnification between 8000 and 15,000 \times using a Gatan slow scan CCD US1000 camera with one second exposition time. Multi-scale cross-correlation alignment using TomoJ were used starting with binning 4 and integer translation.

4.2. Results

4.2.1. Test and validation of SPCI treatments on gold nano-particles

4.2.1.1. Quantitative approach using two symmetric defocused images. The gold nano-particles system is important for evaluating SPCI from a quantitative point of view while the other examples aim at illustrating its potential for biological systems.

Fig. 4 displays the phase image obtained with the two-images SPCI treatment from images of gold nano-particles recording at +40 nm and -40 nm. According to the relation between defocus and resolution, reported in Section 2.1, 40 nm defocus will give a retrieved phase image with appropriate resolution for particles within the range of 1–5 nm. Fig. 4 illustrates the influence of the Tikhonov parameter on the value given by the phase image. As shown in Fig. 4C and E, highlighted details strongly depend on the Tikhonov parameter, namely a higher contrast can be observed for $a = 0.2 \text{ nm}^{-1}$. It should be noted that these profiles represent phase value in radian. For the Tikhonov parameter a -value = 0.02 nm^{-1} , the phase profiles indicate that the phase-shift corresponding to these particles is about 0.5 rad. For the Tikhonov parameter a -value = 0.2 nm^{-1} , the profiles indicate smaller values, of about 0.1 rad. As far as particles are concerned, the phase shift can be simply calculated from the particle size (t) and the mean inner potential V_0 using the relation $\Phi = \pi V_0 t / \lambda E$ (Reimer, 1989). According to the

mean inner potential of gold nano-particles in this size range (Popescu et al., 2007) the expected phase-shift is about 0.6 rad. Therefore, the Tikhonov parameter 0.02 nm^{-1} , with the numerical SPCI treatment which is the minimum one (corresponding to 1 pixel), gives the better match with the expected phase value. In other words, the two-images SPCI plugin is able to provide quantitative phase measurement when the Tikhonov parameter is set to its minimum. It is worth mentioning that the parameter a of the Tikhonov regularization can take any real value. But when dealing with images as above with the SPCI plug in, the a parameter necessarily corresponds to a number of pixels, the pixel unit being defined by the reciprocal space distance $1/Np$ where N is the number of pixel of the image and p the pixel size in direct space. So $a = 1$ pixel is the minimum Tikhonov parameter for the given acquisition conditions (i.e. TEM magnification, camera binning).

The drawback of this choice is that the image contrast is rather poor in comparison with the one obtained with higher Tikhonov parameter. This is rather obvious in Fig. 4E that contrast is improved by the SPCI treatment because the background is removed and particles remains. Furthermore, this is confirmed by the Weber–Fechner contrast (Trémeau et al., 2009) computed from the intensity profile (Fig. 4F). Briefly, this contrast measures the difference between the signal intensity and the background intensity normalized by the background intensity. This value increases 36 times between the Tikhonov a -value = 0.02 nm^{-1} and a -value = 0.2 nm^{-1} . Therefore, depending on the desired application, the two-images SPCI treatment can be a tool for quantitative studies when minimum Tikhonov parameter is used or for qualitative analysis due to a better visualization of specific details by contrast increment. In this last case, SPCI plugin acts as an image filter to emphasize the object of interest.

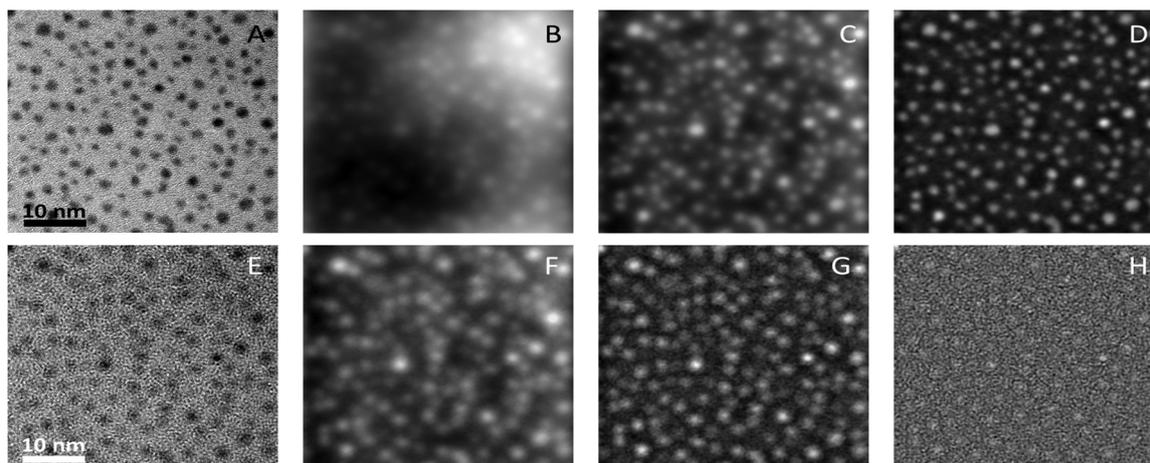


Fig. 5. One-image SPCI treatment applied to gold nano-particles. Figs. A and E show images of a same area recorded for focus images $\Delta z = -20$ nm and $\Delta z = +60$ nm respectively. Figs. B, C and D (respectively F, G, H) display the phase image retrieved with the one-image SPCI treatment from image A (respectively E) for various values of the Tikhonov parameter: $a = 0.06 \text{ nm}^{-1}$; $a = 0.2 \text{ nm}^{-1}$; $a = 0.6 \text{ nm}^{-1}$. The scale bar on the original images A and E represents 10 nm.

The use of SPCI plugin as an image filter can be simplified with the requirement of a single image we described in the next section.

4.2.1.2. Qualitative approach using the one-image SPCI treatment. The one-image treatment implemented in SPCI plugin has been derived from the two-images one by replacing one of the two defocused images by a constant intensity image corresponding to the background value. As emphasized in the previous section, the one-image SPCI treatment is qualitative and cannot be compared to quantitative one-image phase retrieval methods suggested by other authors (Paganin et al., 2002).

Fig. 5A–D displays the results obtained with the one-image SPCI treatment when applied to gold nano-particles images recorded at defocus $\Delta z = -20$ nm. Similarly, the same treatment was applied to an image recorded at defocus $\Delta z = +60$ nm in Fig. 5E–H.

The image in Fig. 5B recorded at $+60$ nm is characterized by a poor quality in comparison with the one recorded at -20 nm defocus (Fig. 5A). However, the related phase image retrieved with the one-image SPCI treatment (Fig. 5B–D and F–H) shows that regardless of the quality of the starting images significant contrast enhancement and noise reduction can be obtained. Similar to the two-images SPCI treatment the choice of the Tikhonov parameter is critical to highlight the object of interest. Moreover, comparison with the two-images SPCI results (Fig. 4), the one-image SPCI treatment is efficient in terms of contrast enhancement and noise reduction. Due to the facility of use and the short computation time, the one-image SPCI treatment should be appropriate to improve low-contrast images produced by biological preparation as we reported in the next section.

4.2.2. Application on biological samples

We have evaluated the efficiency of the one-image SPCI treatment on images from frozen hydrated *E. coli*. It must be taken into account that, due to the object size, the defocus required for biological samples is far from the nanometric scale and frequently goes to 1 or 2 μm . Fig. 6 displays images corresponding to a focus of $+2.496 \mu\text{m}$ and $-2.496 \mu\text{m}$. These images do not provide any information about heterogeneity in bacterial cytoplasm. Furthermore, relative to intensity profiles (Fig. 6E), it is not possible to distinguish the border of the bacterial wall. When the two-images SPCI treatment (Tikhonov parameter a -value = 0.0085 nm^{-1}), is applied to two focused $\pm 2.496 \mu\text{m}$ images, the border of the bacteria becomes visible (Fig. 6C) as demonstrated by the *minima* observed in the corresponding plot profile (Fig. 6E, arrows). With the one-image SPCI treatment (Tikhonov parameter a -value = 0.0085 nm^{-1}) the retrieved phase image and the corresponding profile shows that, not only the borders of the bacteria

appears clearly visible, but some details are also distinguishable within the cytoplasm (Fig. 6D and E). According to the plot profile, four regions can be distinguished: the region outside of the bacteria, the bacterial cell wall (Fig. 6E, arrows), a region close to the cell wall with higher densities (Fig. 6E, brackets) and the inner cytoplasm (Fig. 6E). The region close to the cell wall could be the presence of genetic material that it is known to be close to the membrane in bacteria (Leibowitz and Schaechter, 1975); because of the chemical composition of the DNA, may generate a higher phase value. This result illustrates how the one-image SPCI treatment can help to highlight information otherwise invisible in the original data.

To further evaluate the one-image SPCI treatment interest, we compared it with the widely used Fourier band-pass filter. On a TEM image of an epon embedded section of *E. coli*, although the mitochondrion is identifiable (Fig. 7A), it is no possible to clearly distinguish the cristae due to the low contrast and noise. A Fourier band-pass filter (12–24 nm) enables to enhance mitochondrial borders as show in Fig. 7B. The one-image SPCI treatment gives a phase image (Fig. 7C) where the mitochondria borders are well preserved and the main densities occurring in the mitochondrial lumen can be interpreted as cristae (yellow arrows in Fig. 7).

This example illustrates the differences in filtering operated by a band-pass filter compared with the one-image SPCI treatment. This is accounted by the fact that the band-pass filter evenly transmits all frequencies within the interval defined by the low and high frequencies while the one-image SPCI treatment filtering is described by the Tikhonov function $T(q)$ (Fig. 1). In the present case, the latter is more appropriate as it provides just the right amount of details. It also allows for a better segmentation as illustrated by the color image in Fig. 7D. In other word, the one-image SPCI treatment prevents effects that can be generated by a Fourier band-pass filter whilst enhancing the borders of the objects.

5. Discussion

In the last decades, there has been increasing need for TEM use for the characterization of biologicals and materials science. This has led to new generations of TEM equipments with lens corrector for sub-Ångström resolution, and to the development of powerful imaging techniques like electron holography and electron tomography. However, to take full advantage of those technological progresses, TEMs require to be operated by highly qualified experts and accurate results can only be obtained after preliminary investigations. In that context, it seems particularly relevant to develop approaches

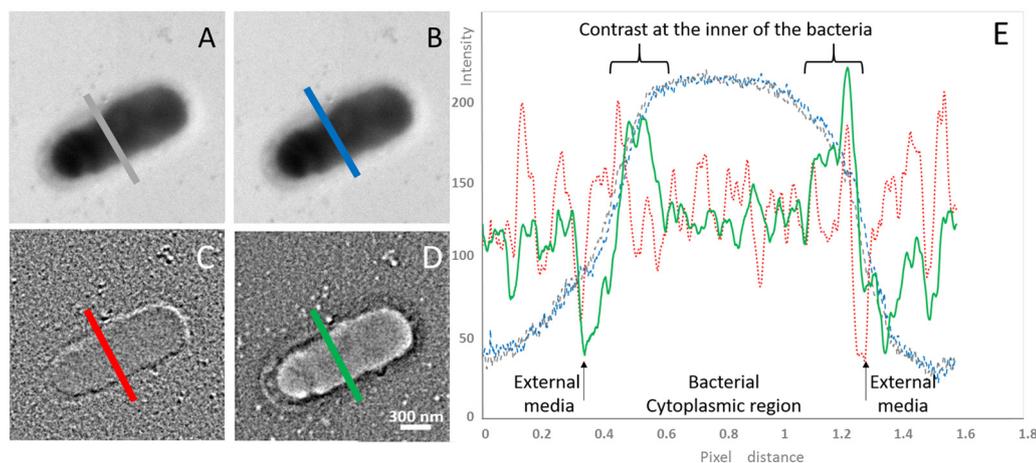


Fig. 6. Comparison of two-images and one-image SPCI treatments in *E. coli* observed by cryo-TEM. (A and B) Raw images acquired at $-2.496\ \mu\text{m}$ and $+2.496\ \mu\text{m}$ of defocus respectively. (C) Phase image obtained with the two-images SPCI treatment with Tikhonov parameters: $\alpha = 0.0085\ \text{nm}^{-1}$. (D) Phase image obtained using the one-image SPCI treatment with image A and the same Tikhonov α -value. Graph E corresponds to intensity profiles of the bacteria *E. coli*. These profiles are recorded along the line of interest across the bacteria as drawn on the TEM images and phase images. Blue and grey lines represents raw focused images, dotted red line to two-images treatment and green line to one-image treatment. In this last one arrows point at the bacterial cytoplasmic region close to borders. Scale bar is 300 nm.

achievable on standard equipment and involving simple numerical treatments in order to be fully carried out and understood by the TEM user. That was the purpose of the work reported here.

In the present manuscript, we have shown that it is possible to propose a simple image treatment based on two defocused images, or even on one defocused image, applicable to phase-contrast images classically acquired in TEM. This image treatment is a simple derivation based on the contrast transfer function. It allows the retrieval of a phase image with a clear view of the underpinning approximation. Therefore, the limits in terms of resolution and quantitative measurements are easy to be defined by the average TEM user.

One main result of this work has been the development of a public ImageJ plugin, SPCI, which can be downloaded from (Verguet, 2018). The strength of SPCI is to involve a single adjustable parameter (the Tikhonov regularization parameter α -value). The plugin dialog box gives the possibility to vary the α -value over a wide range and to display as many images as applied parameters. This is very convenient for the user to make the most appropriate choice of the α -value for contrast enhancement in non-quantitative studies. Also, as demonstrated by the

gold particles example, the two-images SPCI treatment is able to provide accurate quantitative results as far as it is applied with the smallest Tikhonov parameter. This requirement can be understood from the description of the Tikhonov function given in Section 2. The deviation of the Tikhonov function to the $1/q^2$ function gives an indication of the frequency domain from which artifacts may arise. This means that depending on the image characteristics (mainly the long-range contrast fluctuation) the two-images SPCI treatment will provide semi-quantitative results. Ideally, images with no long-range contrast fluctuation should allow for a quantitative use of the phase map. This is what we have observed with the gold nano-particles examples when the minimum possible value is used.

Since the choice of the smallest size for the Tikhonov parameter, is required for quantitative studies, this choice becomes obvious since the image manipulation is performed in pixel units (*i.e.* it means taking 1 pixel). Actually in addition to the pixel number indicated in the dialog box, the value of α can be tuned by changing the acquisition conditions since the size of a pixel in the reciprocal space (*i.e.* $1/Np$) depends on them. It is worth noticing that reducing the magnification allows to

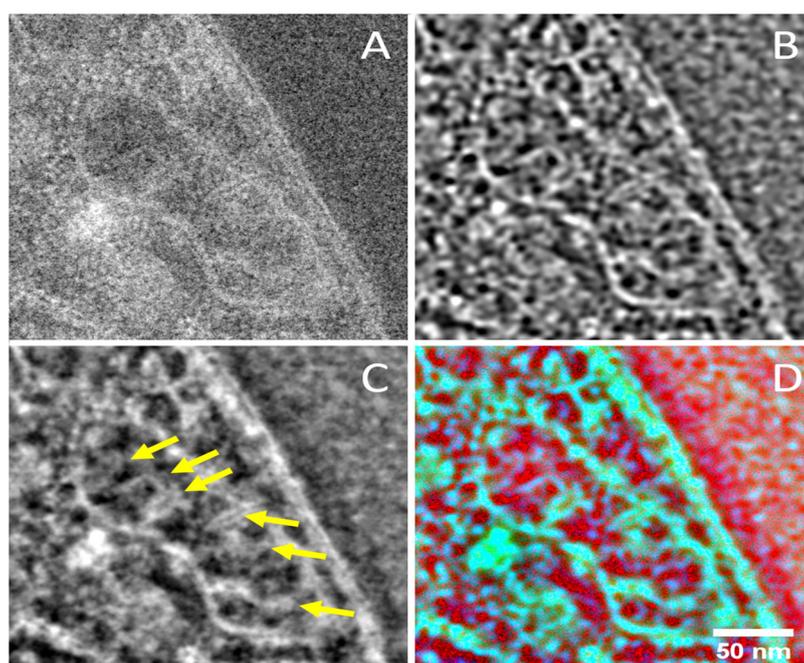


Fig. 7. Comparison of one-image SPCI treatment versus band-pass filter in the identification of mitochondrion cristae. (A) Raw image defocused at $+83\ \text{nm}$. (B) Band-pass filtered image (frequencies corresponding to 12–24 nm in real space which heuristically highlight sub-cellular structures in this sample). (C) Phase image resulting from one-image SPCI treatment with a Tikhonov parameter of $0.012\ \text{nm}^{-1}$. The cristae, identified by yellow arrows, appears clearly visible. (D) Overlapping of the previous images with raw image in red channel, band-pass filtered image in blue channel and one-image SPCI-phase image in green channel. Of note, the small red dots, corresponding to high frequency noise, occur all over the image. These dots are removed by both band-pass and one-image SPCI treatment. However, it should be noticed that the band-pass is associated with artifacts depicted by the blue densities that are absent in the SPCI green image. Scale bar is 50 nm.

explore small values of a which can be out of reach with high magnification. The interest of the a -value in pixels is to realize how far the chosen parameter is from the minimum value for the given acquisition condition. Because of the a -value in nm^{-1} the operator has a direct information on the length scale that will be enhanced by the Tikhonov regularization. As a consequence, it makes easier for the user to understand how the experimental conditions should be changed. Typically, the magnification should be chosen in order that the meaningless information, such as the scale of the long-range contrast fluctuation, is as large as possible with respect to the image size while the meaningful details remain small with respect to the image size.

As the SPCI plugin offers two possible modes, their respective limits and advantages have to be discussed. At first the choice for the one-image or two-images SPCI treatment depends on the needs of qualitative or quantitative information. If a qualitative information is desired, the two-images SPCI treatment should be performed. Indeed, the one-image treatment can be quantitative as long as the first requirement of knowing the zero-defocus image is fulfilled. To avoid any misuse, it is explicitly indicated on the dialog box that the one-image SPCI treatment is not a quantitative approach. If the sample is a weak phase object, the zero-defocus image is recognized by its absence of contrast. Unfortunately, this zero contrast may be difficult to observe because of small local effects of diffraction and/or absorption, and also because the sample may not be flat. As a consequence, the errors on the focus value and the zero-focus image prevent from using the one-image SPCI treatment for phase measurement. However, it must be said that phase retrieval can be performed on the basis of a single image and it has been successfully applied in X-ray (Paganin et al., 2002) and TEM (Liu et al., 2011) imaging. This was possible due to the sophisticated reconstruction algorithms and when dealing with homogeneous and simple objects. However, the objective of the present work is to propose the simplest approach even at the expense of spatial resolution of quantitative phase information, provided that the users have a clear understanding of the methodological limits.

If a qualitative information is desired, for instance when the characterization of an object's size and shape are of interest, the images obtained with the one-image SPCI treatments can be exploited. In that case, the one-image SPCI treatment provides images with a significant gain of contrast facilitating automatic segmentation by simple thresholding. From that point of view, the one-image treatment is clearly advantageous on the two-images one. First with the one-image treatment, image alignment is not necessary. Therefore, there is no risk of artifact on the object size due to too ill corrected misalignment. This is particularly important for biological samples as they require high defocus inducing specific image distortion preventing from good alignment of the two images focal series. Also even if the two-images SPCI treatment is chosen in view of quantitative results, the one-image SPCI treatment is always worth doing in order to detect artifact due to incorrect image alignment. This is a preliminary step required for shape descriptors and dimension studies, which can be directly performed in the ImageJ software where SPCI plugin has been implemented.

As illustrated in Section 4, the one-image SPCI treatment can be seen as a type of band-pass filter. The filtering functions are also significantly different: a top hat shape in reciprocal space for the band-pass filter and a kind of bell shape for the Tikhonov function. As a consequence, the band-pass filter requires to adjust two parameters while the Tikhonov function has only one adjustable parameter. One shape or the other might be more appropriate depending on the spatial frequency characteristic of the system of interest as illustrated by Fig. 7. Additionally, since the SPCI plugin allows for trying and displaying the results obtained for several a -values, it is rather easy to determine the optimum conditions in a single run. Second, although the phase image given by the one-image SPCI treatment cannot be quantitative, there is still a direct connection between the one-image SPCI treatment and the phase-contrast, while a band-pass filter is applicable to any types of image regardless of the contrast used to form the image. This means

that the phase image given by the one-image SPCI treatment still bears a physical meaning related to the phase-contrast.

With the development of techniques like electron holography or holo-tomography and of devices like phase plates, phase-contrast information appears as extremely relevant in material sciences and biology. Therefore, the one-image SPCI treatment can appear quite fruitful despite its limits. For instance, it might be beneficial for beam sensitive systems, such as frozen hydrated samples in biology, or in material science systems in which electron holography or holo-tomography could be of interest but appear unfeasible. Of course, the one-image SPCI treatment cannot be an alternative to these techniques. We only propose to use it when advanced methods cannot be carried out or in a preliminary investigation to these advanced techniques. Also considering the growing interest of phase plates for biological system, images bearing phase information may be of specific interest even though they cannot be quantitative in terms of phase measurements.

6. Conclusion

To summarize, we propose here a plugin which gives the possibility to retrieve phase images from TEM phase-contrast images obtained with standard microscopes by users not specialized in electron optics. Depending on the needs and the system, a quantitative approach (*i.e.* using two symmetric focused images) or a qualitative approach based on a single image is possible. The aim of this plugin is to make phase retrieval possible at a basic level as a preliminary investigation prior to accurate studies on specialized microscopes. Alternatively, the qualitative application of the plugin can be of interest as a new image processing able of selective contrast enhancement. For example, it can be useful for the study of the low contrasted objects specifically frequent in cryo TEM of biological systems.

Acknowledgment

We are grateful to Prof. G.A. Botton from CCEM-Canadian Center for Electron Microscopy for the nano-particle imaging facilities and to Sylvain Trépot for the *T. brucei* grid and the critical reading of the manuscript. We acknowledge the PICT-IBISA for providing access to their image equipment. A. Verguet is recipient of a CIFRE grant and is supported by JEOL (Europe) SAS.

References

- Donnadieu, P., Lazar, S., Botton, G.A., Pignot-Paintrand, I., Reynolds, M., Perez, S., 2008. Seeing structures and measuring properties with transmission electron microscopy images: a simple combination to study size effects in nanoparticle systems. *Appl. Phys. Lett.* 94. <https://doi.org/10.1063/1.3168525>. ISI:000267697300053.
- Ishizuka, K., Allman, B., 2005. Phase measurement of atomic resolution image using transport of intensity equation. *J. Electron Microsc.* 54, 191–197. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfi024>.
- Karupphasamy, M., Nejedasl, F.K., Vulovic, M., Koster, A.J., Raveli, R.B.G., 2011. Radiation damage in single-particle cryo-electron microscopy: effects of dose and dose rate. *J. Synchrotron Radiat.* 18, 398. <https://doi.org/10.1107/S090904951100820X>.
- Koch, C.T., 2014. Towards full-resolution inline electron holography. *Micron* 63, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.10.009>.
- Leibowitz, P.J., Schaechter, M., 1975. The Attachment of the Bacterial Chromosome to the Cell Membrane. *Int. Rev. Cytol.* 41, 1–28. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60964-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60964-X).
- Liu, A.C.Y., Paganin, D.M., Bourgeois, L., Nakashima, P.N.H., 2011. Projected thickness reconstruction from a single defocused transmission electron microscope image of an amorphous object. *Ultramicroscopy* 111, 959–968 doi: 10.1016/j.ultramicro.2011.03.007.
- Messaoudi, C., Boudier, T., Sorzano, C.O.S., Marco, S., 2007. TomoJ: tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. *BMC Bioinform.* 8, 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-288>.
- Messaoudi, C., 2011. TomoJ. URL: <https://sourceforge.net/projects/tomoj> (Online; accessed 27.11.2018).
- Mitome, M., Ishizuka, K., Bando, Y., 2010. Quantitativeness of phase measurement by transport of intensity equation. *J. Electron Microsc.* 59, 33–41. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfp046>.
- O'Keefe, M.A., Hetherington, C.J.D., Wang, Y.C., Nelson, E.C., Turner, J.H., Kisielowski,

- C., Malm, J.O., Mueller, R., Ringnald, J., Pan, M., Thust, A., 2001. Sub-Ångstrom high-resolution transmission electron microscopy at 300 keV. *Ultramicroscopy* 89, 215–241. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(01\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(01)00094-8).
- Paganin, D., Nugent, K.A., 1998. Noninterferometric phase imaging with partially coherent light. *Phys. Rev. Lett.* 80, 2586–2589. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.80.2586>.
- Paganin, D., Mayo, S.C., Gureyev, T.E., Miller, P.R., Wilkins, S.W., 2002. Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *J. Microsc.* 206, 33–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2002.01010.x>.
- Popescu, R., Müller, E., Wanner, M., Gerthsen, D., Schowalter, M., Rosenauer, A., Böttcher, A., Löffler, D., Weis, P., 2007. Increase of the mean inner Coulomb potential in Au clusters induced by surface tension and its implication for electron scattering. *Phys. Rev. B* 76, 235411. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.76.235411>.
- Reimer, L., 1989. *Transmission Electron Microscopy – Physics of Image Formation and Microanalysis*. Springer. URL: <https://www.springer.com/de/book/9783662215791>.
- Schiske, P., 2002. Image reconstruction by means of focus series. *J. Microsc.* 207, 154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2002.01042.x>.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671. URL: <https://imagej.nih.gov/ij> (pMID: 22930834).
- Thevenaz, P., Ruttimann, U.E., Unser, M., 1998. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7, 27–41. <https://doi.org/10.1109/83.650848>.
- Trémeau, A., Schettini, R., Tominaga, S., 2009. *Computational Color Imaging*. Springer Berlin Heidelberg.
- Trépout, S., Tassin, A.M., Marco, S., Bastin, P., 2018. STEM tomography analysis of the trypanosome transition zone. *J. Struct. Biol.* 202, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.12.005>.
- Tseng, Q., 2018. Template Matching and Slice Alignment, ImageJ Plugins. URL: <https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin> (Online; accessed 27.11.2018).
- Van Dyck, D., Lichte, H., van der Mast, K.D., 1996. Sub-ångström structure characterisation: the Brite–Euram route towards one ångström. *Ultramicroscopy* 64, 1–15. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(96\)00057-5](https://doi.org/10.1016/0304-3991(96)00057-5).
- Verguet, A., 2018. SPCI Plugin Distribution. URL: <http://www.cmib.fr/en/download/softwares/SPCI.html> (Online; accessed 27.11.2018).
- Wendykier, P., Nagy, J.G., 2010. Parallel colt: a high-performance Java library for scientific computing and image processing. *ACM Trans. Math. Software* 37, 1–22. <https://doi.org/10.1145/1824801.1824809>.

Annexe D

Chapitre du livre - Cellular Imaging (Electron Tomography and Related Techniques), Hanssen Eric, Springer edition

Chapter 7 : Alignment of tilt series

Verguet Amandine, Messaoudi Cédric, Sorzano C.O.S., et Marco Sergio.

Publié le 28 mars 2019

Parue dans le livre **Cellular Imaging - Electron Tomography and Related Techniques**, Hanssen Eric, *Springer* <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68997-5>

Abstract

Computing of three-dimensional reconstructions from images obtained by transmission electron tomography needs three main steps : data acquisition, projection alignment, and 3D reconstruction. In this chapter we will focus on the process of alignment moving from the justification of its need to the study of the different classical approaches (cross-correlation, use of added fiducial markers) that have been commonly used in this alignment process. We will also discuss the most recent algorithms (multiscale registration, invariant feature recognition) as they have been adapted to Electron Tomography and improved to increase the accuracy and resolution of the final tomograms.

Titre : Développements méthodologiques et informatiques pour la microscopie électronique en transmission appliqués à des échantillons biologiques

Mots clés : Microscopie électronique en transmission et à balayage ; Tomographie électronique ; Traitement d'image ; Reconstruction tridimensionnelle ; Contraste de phase.

Résumé : La microscopie électronique en transmission est une technique pertinente pour les études structurales en biologie. Certaines méthodes d'acquisition et d'analyse doivent être améliorées pour permettre l'observation d'échantillons sensibles aux doses d'électrons dans de bonnes conditions de contraste et de rapport signal sur bruit. Au cours de cette thèse, j'ai exploré différentes approches méthodologiques et informatiques dans le but d'améliorer la qualité des images.

J'ai ainsi évalué la pertinence de la combinaison de l'imagerie en énergie filtrée avec le mode STEM. Je montre que cette combinaison est prometteuse puisqu'elle permet d'améliorer le rapport signal sur bruit des images.

Par ailleurs, j'ai collaboré à des développements algorithmiques et logiciels pour la reconstitution d'images de contraste de phase. Ceci permet l'amélioration du contraste par rapport à une acquisition classique. Je montre aussi qu'à cette fin, la phase plate tout comme les séries focales sont des outils efficaces. En étudiant une approche logicielle pour l'exploita-

tion des séries focales, nous avons déterminé qu'il est possible d'obtenir, en plus de données quantitatives, un résultat qualitatif à partir d'une seule image. J'ai ainsi développé le plugin SPCI pour le logiciel ImageJ, qui permet de traiter de une à trois images focales.

Je m'intéresse également à l'optimisation du processus de reconstruction tomographique, tant à l'alignement qu'à la reconstruction proprement dite. L'approche évaluée pour l'alignement utilise des points caractéristiques associés à des descripteurs locaux. Elle s'est montrée performante et permet de traiter des images sans marqueurs fiduciaux.

Enfin, je propose une nouvelle méthode unifiée de reconstruction tridimensionnelle de séries tomographiques parcimonieuses. Il en découle une approche innovante mélangeant reconstruction et alignement dont l'ébauche servira de base à des travaux futurs pour le traitement de séries tomographiques parcimonieuses.

L'ensemble des méthodes évoquées ici, leur validation, ainsi que les perspectives d'évolution associées sont décrites dans ce manuscrit.

Title : Methodological and computing developments for transmission electron microscopy applied to biological samples

Keywords : Scanning transmission electron microscopy ; Electron tomography ; Image processing ; Three dimensional reconstruction ; Phase contrast.

Abstract :

Transmission Electron Microscopy is a major tool for performing structural studies in biology. Some methods used for image sampling and analysis need to be improved in order to observe electron dose sensitive samples with good contrast and good signal to noise ratio. During this thesis, various methodological and computational approaches have been studied which aim to improve image quality.

First, I evaluated the relevance of combining energy filtered imaging with the STEM mode. I show that this allows an improvement of the signal to noise ratio of images.

Then, I devised an algorithm that generates an image from phase data. This approach allows improving the image contrast over direct imaging. The use of a phase plate and focal tilt series are both efficient tools to achieve this goal. While working on the software approach for processing of tilt series, we found that a

qualitative result can be obtained from a single image. I developed the SPCI plugin for the ImageJ software. It allows processing between one and three focal images.

My work involves optimization of the tomographic reconstruction process, including working with both alignment algorithms and reconstruction algorithms. I expose my studies on image alignment methods used on tilt series. These methods do rely on the use of key points and associated local descriptors. They have proved to be efficient to process images lacking fiducial markers.

Finally, I propose a new unified algorithmic approach for 3D reconstruction of tomographic tilt series acquired with sparse sampling. I then derived another novel method that integrates the image alignment step in the process. Studies and developments will continue on both methods in futur work.

