



**HAL**  
open science

# Stratégies avancées d'imagerie multiphoton pour l'étude de processus périodiques rapides in vivo : des cils motiles au cœur battant

Guillaume Pakula

## ► To cite this version:

Guillaume Pakula. Stratégies avancées d'imagerie multiphoton pour l'étude de processus périodiques rapides in vivo : des cils motiles au cœur battant. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLX018 . tel-03227470

**HAL Id: tel-03227470**

**<https://theses.hal.science/tel-03227470v1>**

Submitted on 17 May 2021

**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.

Stratégies d'imagerie multiphotonique avancées  
pour l'étude de processus périodiques rapides  
*in vivo* : des cils motiles au coeur battant

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'École polytechnique

École doctorale n°573 Interfaces : approches interdisciplinaires,  
fondements, applications et innovation  
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 12 avril 2019, par

**Guillaume PAKULA**

Composition du Jury :

Philippe Andrey Directeur de Recherche, AgroParisTech (INRA)	Président
Raphaël Candelier Chargé de Recherche, UMPC (CNRS)	Rapporteur
Martin Oheim Directeur de Recherche, Université Paris V (CNRS)	Rapporteur
Michael Liebling Directeur de Recherche, IDIAP (LIDIAP)	Examineur
Willy Supatto Chargé de Recherche, Ecole Polytechnique (CNRS)	Directeur de thèse



---

## Remerciements

Une fois n'est pas coutume, je ne vais pas m'épancher ; j'ai finalement déjà fait mes remerciements aux personnes qui m'ont accompagné et soutenu, tacitement ou non. Il est parfois plus élégant de suggérer les choses que de les énoncer formellement. Par pudeur dirons-nous, je ferai pour une fois preuve d'un peu d'élégance.

Malgré tout, je tenais à remercier tous ceux qui ont permis ces travaux. J'ai longtemps voulu m'abstenir d'écrire ces remerciements qui me semblent un brin impudiques. Mais dans la suite, il est plutôt question de rendre en quelques lignes tout ce qui m'a été donné au cours de ces trois années. Je commencerai donc par la fin, le jury : Raphaël Candelier, Martin Oheim, Philippe Andrey et Michael Liebling, que je remercie pour leur expertise, leur bienveillance et pour avoir donné de leur temps à l'évaluation de ces trois ans de (dur) labeur.

Ce projet fut avant tout façonné par les collaborateurs avec qui nous avons travaillé. A sa genèse, l'équipe de Bitplane qui m'a accueilli en terre helvétique en aura posé les jalons. Peter, Igor et les autres : je les remercie chaleureusement pour leur disponibilité, leur patience et de la gentillesse dont ils ont su faire preuve. J'espère qu'ils savent à quel point j'ai aimé travailler à leurs côtés.

La thèse ensuite, n'a pas été le chemin de croix annoncé. Je la décrirais plutôt comme un sentier paisible, jonché çà et là de microscopes, d'embryons de poissons-zèbres et de gens intelligents.

Le long de ce bonhomme de chemin, les collaborations ont permis d'éclairer les voies prometteuses. L'association avec l'équipe de Julien Vermot à Strasbourg aura relevé le défi de m'initier à la biologie. L'enthousiasme, l'abnégation et la rigueur dont Julien et Rita ont fait preuve ne m'ont pas laissé d'autre choix que de me faire apprécier la discipline. Je remercie également Andrej Vilfan qui complète cette équipe pour le moins hétéroclite, au contact de laquelle j'ai beaucoup appris.

L'autre pan de ma thèse qui traite de l'étude du cœur aura été plus prospectif. Michael Liebling (encore lui) y a joué un rôle prépondérant et ses travaux m'ont beaucoup inspiré. La collaboration fut riche à tous les niveaux ; voilà donc une double ration de remerciements pour lui. De la même manière je tiens à remercier l'équipe de Nadia Mercader, avec qui nos échanges furent cependant plus ponctuels. Enfin, je souhaiterais adresser de chaleureux remerciements à Karine Guevorkian dont la collaboration aura permis à de nombreux petits œufs de découvrir le RER B, et accessoirement de percer les mystères de la contraction cardiaque chez l'embryon de poulet. Dans un autre style de collaboration, je tenais également à remercier Alain Louis-Joseph qui m'a fait confiance pour encadrer le MODAL à ses côtés. Cette expérience d'enseignement a sûrement taillé un bout du chemin que j'emprunte aujourd'hui.

Étudier les embryons de poissons impose une contrainte de taille : disposer d'embryons de poissons. Sans le travail remarquable de l'équipe de l'animalerie, les résultats de cette thèse n'auraient pas pu être ce qu'ils sont aujourd'hui (et par cela j'entends : excellents !). Bravo à Emilie, Nicolas, Isabelle et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce que cette modeste "poissonnerie" devienne le Nausicaa du plateau de Saclay.

L'étau des remerciements se resserre. La suite concernera donc le théâtre de toutes ces péripéties : le Laboratoire d'Optique et Biosciences. Durant ces trois ans, il a su m'accueillir et me donner tous les moyens et ressources pour y travailler, dans un environnement d'excellence

à la fois stimulant mais pour autant très humain. Ce laboratoire est finalement à l'image de celui qui le dirige, François Hache, pour qui j'éprouve beaucoup de respect et de sympathie. Je le remercie vivement de sa bienveillance, de sa capacité d'écoute et de l'opportunité qui m'a été offerte de rejoindre les rangs du laboratoire. De manière connexe, je souhaite remercier le chef de notre pôle, Emmanuel, qui rayonne de tout son charisme et de son expertise à ceux qui le fréquentent. Je profite de l'occasion pour remercier tous les membres du pôle microscopie, Pierre en tête, dont la patience et la rigueur n'en finiront jamais de m'impressionner. Merci à lui de m'avoir montré la voie lorsque je n'étais qu'un aspirant microscopiste. Je remercie aussi ceux qui m'ont assisté au plan technique, Anatole, Ernan ou Jean-Christophe, les travailleurs de l'ombre du laboratoire sans qui les choses n'iraient pas aussi bien. Enfin, j'aimerais remercier les secrétaires du laboratoire, Christelle et Laure, qui m'ont permis de faire taire ma phobie administrative le temps d'une thèse.

J'ai tout naturellement gardé le meilleur pour la fin. Le meilleur, c'est Willy, sans l'ombre d'une contestation. J'ai tantôt invoqué la pudeur, mais je pense qu'il est important que ceux qui lisent ces lignes sachent à quel point il a été un encadrant de thèse exemplaire et à quel point j'ai aimé travailler à ses côtés. La vie est parfois une affaire de chance, j'en ai eu énormément. Merci pour tout ton temps, ton talent, ta bienveillance et tout le reste. Merci pour ton perfectionnisme éclairé et pour la rigueur dont tu fais preuve et qui me fait parfois défaut. Je me sais un peu fantasque dans ma manière de travailler ; j'espère que tu ne m'en tiens pas rigueur et que toi aussi tu as apprécié travailler avec moi pendant ces quelques années.

Dans un dernier paragraphe, je souhaiterais remercier en vrac tous ceux que je n'ai pas cités. Ils sont ceux qui ont rendu ces temps de thèse inoubliables, qu'ils soient famille, amis, collègues, membres de l'équipe, qu'ils aient partagés mon bureau ou qu'ils soient biologistes, mais aussi tous les autres. Quels qu'ils soient, ils se reconnaîtront et ça me va bien comme ça.



# Table des matières

Table des matières	vii
Table des figures	ix
<b>1 Microscopie multiphoton pour l'imagerie du vivant</b>	<b>3</b>
1.1 Introduction aux oscillateurs biologiques	4
1.1.1 Générer des oscillations	4
1.1.2 Échelles temporelles et spatiales des oscillations	5
1.1.3 Deux oscillateurs biologiques : du cœur battant au cil motile	5
1.2 Imagerie pour la biologie	7
1.2.1 Techniques d'imagerie du vivant	7
1.2.2 Microscopie optique	7
1.2.3 Microscopie multiphoton	8
1.2.4 Microscopie de fluorescence excitée à 2 photons pour la biologie	15
1.2.5 La microscopie SHG et THG pour la biologie	16
1.2.6 La microscopie multiphoton pour imager les cils et le cœur	18
1.3 Imager plus vite	19
1.3.1 Résolutions spatiale et temporelle : le grand compromis ?	19
1.3.2 Imagerie dynamique : quelle résolution temporelle ?	19
1.3.3 État de l'art de la vitesse d'imagerie	21
1.4 Stratégies d'imagerie pour l'étude de phénomènes périodiques	30
1.5 Références	30
<b>2 Stratégie d'imagerie des cils cellulaires motiles à l'étude de la spécification de l'axe gauche-droite</b>	<b>37</b>
2.1 Introduction	38
2.1.1 Cils cellulaires et l'asymétrie gauche-droite	38
2.1.2 La brisure de symétrie gauche-droite chez l'embryon de poisson-zèbre	43
2.1.3 Approche expérimentale : exploiter les artefacts de balayage	47
2.2 3D-CiliaMap : quantification et analyse systématique des paramètres biophysiques des cils	49
2.2.1 Introduction à la chaîne de traitement des données expérimentales	49
2.2.2 Acquisition des images de la vésicule de Kupffer	52
2.2.3 Enregistrement des données	59
2.2.4 Extraction des paramètres biophysiques des cils	66
2.2.5 Exploration des données et résultats biologiques	73
2.3 Perspectives	82
2.3.1 Vers une simulation de la vésicule de Kupffer	82
2.3.2 Amélioration de la chaîne de traitement par apprentissage automatique	84
2.3.3 Vers l'imagerie 3D dynamique des cils	86
2.4 Conclusion	87
2.5 Références	87



<b>3</b>	<b>Résoudre le cycle cardiaque in vivo</b>	<b>93</b>
3.1	Introduction	94
3.1.1	Structure du muscle cardiaque et source de signal SHG	94
3.1.2	Limites des l'imagerie à fluorescence et SHG des muscles	100
3.1.3	Déclenchement prospectif, rétrospectif	105
3.2	Exploiter la périodicité pour imager plus vite	109
3.2.1	Stratégie et objectifs de l'imagerie XTYZ	109
3.2.2	Dispositif d'acquisitions XTYZ avec signal de référence	114
3.2.3	Paramètres d'acquisition	123
3.2.4	Implémentation de la reconstruction XTY	132
3.3	Résultats	145
3.3.1	Performances d'imagerie	145
3.3.2	Une reconstruction XTYZ exacte et précise	147
3.3.3	Robustesse aux apériodicités	153
3.3.4	Débruitage par repliement de cycles : phototoxicité et signaux faibles	158
3.3.5	Suivi dynamique des sarcomères au cours de la contraction cardiaque par microscopie SHG	163
3.3.6	Imagerie multimodale	170
3.3.7	Imagerie d'un autre modèle : l'embryon de poulet	174
3.4	Perspectives	180
3.4.1	Amélioration de la reconstruction XTYZ	180
3.4.2	Imagerie SHG du cœur	184
3.4.3	Imagerie calcique	187
3.4.4	Systèmes périodiques ou stimulables	187
3.5	Conclusion	190
3.6	Références	190

# Table des figures

1.1	Exemple d'un oscillateur biologique : le rythme circadien. . . . .	4
1.2	Les cycles biologiques aux différentes échelles temporelles . . . . .	5
1.3	Les deux oscillateurs biologiques qui seront étudiés dans ce manuscrit . . . . .	6
1.4	Aperçu des différentes techniques d'imagerie biologique . . . . .	8
1.5	Principales techniques de microscopie à fluorescence. . . . .	9
1.6	Diagrammes de Jablonski pour les modes de contrastes linéaires et non linéaires. . . . .	9
1.7	Comparaison du mode d'excitation par laser continu à une source à impulsions ultrabrèves . . . . .	10
1.8	Confinement du volume focal. . . . .	11
1.9	Phototoxicité : la pyramide de la frustration . . . . .	12
1.10	Profondeur de pénétration de l'illumination 2-photon. . . . .	13
1.11	Courbes d'absorption des différents éléments constitutifs des tissus biologiques . . . . .	14
1.12	Courbe de l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la longueur d'onde . . . . .	15
1.13	Exemples de spectres de quelques protéines fluorescentes typiques en 2-photon . . . . .	16
1.14	Interférences constructives et destructives du signal SHG dans les milieux . . . . .	17
1.15	Réponse spectrale du signal 2PEF et SHG pour une illumination donnée. . . . .	17
1.16	Source de signal SHG dans les biopolymères du vivant . . . . .	18
1.17	Les différentes échelles des deux structures biologiques étudiées dans ce manuscrit . . . . .	20
1.18	Influence de la dynamique sur la résolution spatiale . . . . .	21
1.19	Résolution spatiale maximale limitée par flou cinétique, pour le cœur et le cil motile . . . . .	22
1.20	Microscopie à balayage point par point . . . . .	22
1.21	Illustration de l'artefact de balayage à l'imagerie d'un objet dynamique . . . . .	23
1.22	Techniques classiques de parallélisation de l'excitation et de la détection en microscopie multiphoton . . . . .	25
1.23	Efficacité de collection proposée par un détecteur ponctuel en microscopie 2-photon . . . . .	27
1.24	Récapitulatif des techniques de parallélisation et de leur avantages respectifs . . . . .	28
1.25	Récapitulatif de méthodes d'amélioration de vitesse d'imagerie et de leur taux pixels associé . . . . .	29
2.1	Disposition interne asymétrique des organes chez l'Homme . . . . .	39
2.2	Schématisation des différents défauts de latéralité chez l'Homme. . . . .	40
2.3	Exemples de troubles recensés comme ciliopathies . . . . .	41
2.4	Schéma de la structure d'un cil cellulaire . . . . .	42
2.5	Évènement initial de brisure de symétrie chez la souris . . . . .	43
2.6	Imagerie en microscope à contraste interférentiel de la vésicule de Kupffer chez l'embryon de poisson-zèbre . . . . .	44
2.7	Développement de l'embryon de poisson-zèbre entre les stades 3 et 14 somites . . . . .	44
2.8	Modèles d'asymétries spatiales de battement d'un cil pour générer un flux directionnel à bas nombre de Reynolds . . . . .	45
2.9	Image en microscopie à fluorescence d'une vésicule de Kupffer . . . . .	46

2.10	Quantification du flux directionnel dans la vésicule par pistage 3D de particules	47
2.11	Quantification du flux autour d'un cil individuel par pistage de particules	48
2.12	Tableau des paramètres biophysiques à extraire de la vésicule de Kupffer.	49
2.13	Diagramme de la chaîne de traitement à l'analyse des paramètres biophysique de la vésicule de Kupffer.	51
2.14	Les deux types d'acquisition nécessaires à l'analyse de la vésicule.	53
2.15	Images provenant des deux canaux d'imagerie de la vésicule.	53
2.16	Principe des artefacts de balayage lors de l'imagerie des cils.	54
2.17	Principe de fonctionnement de simulation d'un cil unique.	56
2.18	Comparaison de l'acquisition d'un cil réel avec une simulation.	58
2.19	Comparaison des images simulées pour différents RSB.	59
2.20	Utilisation du Reference Frame pour le repérage des axes biologiques.	61
2.21	Étapes d'extraction des paramètres de position et d'orientation des cils.	62
2.22	Enregistrement de la forme de la vésicule grâce à la position de la base des cils.	63
2.23	Transformation de l'ellipsoïde vers une sphère unité.	63
2.24	Illustration de la définition de la base local de chaque cil.	65
2.25	Classification des types de cils sous Imaris.	66
2.26	Principe de la détection de l'axe de précession des cils.	67
2.27	Performance de la détection de l'orientation à partir d'un jeu de 5000 cils simulés.	69
2.28	Influence des paramètres sur la détection de l'orientation.	70
2.29	Principe de la mesure d'ouverture du cône d'un cil	71
2.30	Décomposition de Voronoi de la distribution des cils sur la sphère.	73
2.31	Chiralité de l'orientation des cils de la vésicule aux stades 9-14 somites	75
2.32	Test de permutation pour l'analyse de la chiralité de la vésicule au stade 8 somites.	77
2.33	Établissement de la chiralité dans la vésicule de Kupffer du type sauvage au cours du temps	78
2.34	Établissement de la chiralité dans la vésicule de Kupffer du mutant <i>dnaaf1</i> <sup>-/-</sup> entre le stade 3 et 8 somites	79
2.35	Procédure d'extraction des corps basaux dans la vésicule de Kupffer	80
2.36	Déplacement des corps basaux relativement à l'étendue de la cellule dans les axes AP et RL	80
2.37	Évolution de la longueur des cils au cours du temps, chez le sauvage et le mutant <i>dnaaf1</i> <sup>-/-</sup>	81
2.38	Établissement de la chiralité des orientations des cils au cours du temps	82
2.39	Comparatif d'une vésicule simulée numériquement à une vésicule réelle acquise au microscope	83
2.40	Détection et étiquetage de régions d'intérêt	85
2.41	Hypothèse de la transition entre deux types de battements asymétriques spatiaux en fonction de la taille du cil	86
3.1	Système cardio-vasculaire de l'embryon de poisson-zèbre à 72 hpf	95
3.2	Développement du cœur de poisson-zèbre au cours des 5 premiers jours	96
3.3	Aspect visuel des différents types de muscles	97
3.4	Schéma de la décomposition d'un muscle	98
3.5	Schéma de la structure et du fonctionnement d'un sarcomère	98
3.6	Tableau des variabilités de longueur de sarcomère entre espèces	99
3.7	Schéma de la structure des filaments épais composés d'un polymère de myosine	100
3.8	Forme caractéristique d'un sarcomère en contraste SHG	101
3.9	Reconstruction haute-vitesse d'un cœur battant de poisson-zèbre.	102
3.10	Imagerie SHG d'un échantillon de cœur humain adulte	103
3.11	Imagerie SHG/THG 3D du cœur de poisson-zèbre arrêté <i>in vivo</i>	103
3.12	Étude dynamique des sarcomères squelettiques par balayage de lignes	104

3.13	Principe du déclenchement pour l'imagerie du cycle cardiaque. . . . .	107
3.14	Reconstruction d'un volume (xyzt) à partir de plan (xyt) périodiques dans le temps. . . . .	108
3.15	Acquisition de lignes séquentielles périodiques pour améliorer la vitesse d'imagerie . . . . .	110
3.16	Comparaison des modes XYT et XTY pour l'acquisition d'un plan dynamique	111
3.17	Utilité de la représentation en kymogrammes pour la synchronisation temporelle des lignes. . . . .	112
3.18	Schéma explicatif de la différence entre exactitude et précision. . . . .	113
3.19	Diagramme de fonctionnement de la chaîne de traitement de la synchronisation XTY. . . . .	114
3.20	Schéma du montage expérimental du microscope TriMScope et de l'implémentation du module de référence. . . . .	116
3.21	Tableau des avantages et désavantages des positions envisagées pour le module de référence. . . . .	117
3.22	Courbes de transmission et d'intensité normalisées des miroirs dichroïques et filtres utilisés . . . . .	118
3.23	Principe de la modulation de la référence par le battement cardiaque. . . . .	119
3.24	Principe de l'illumination de Köhler. . . . .	120
3.25	Montage expérimental du module de référence. . . . .	121
3.26	Influence de la fermeture des diaphragmes de champ et d'ouverture sur l'illumination au plan d'imagerie. . . . .	122
3.27	Preuve de l'invariance du signal de référence aux mouvements Z. . . . .	122
3.28	Pyramide de la frustration pour l'acquisition XTYZ. . . . .	123
3.29	Schéma explicatif de la conversion comptes/photons du TriMScope. . . . .	127
3.30	Contrôle du gain des PMT en fonction de la tension appliquée. . . . .	128
3.31	Effet de l'extension des images sur les paramètres d'acquisition. . . . .	129
3.32	Diagramme de fonctionnement de l'algorithme de reconstruction d'une image XTYZ . . . . .	134
3.33	Principe de fonctionnement de la minimisation de la longueur de corde. . . . .	137
3.34	Comparaison typique d'un kymogramme dont la période a été estimée le canal de référence et le canal de fluorescence. . . . .	139
3.35	Repliement de plusieurs cycles via le kymogramme d'une ligne. . . . .	140
3.36	Interface utilisateur de la synchronisation par maximisation de correspondance	144
3.37	Exemple d'image obtenue par imagerie XTY à 800 Hz . . . . .	146
3.38	Schéma récapitulatif des méthodes de reconstruction . . . . .	148
3.39	Reconstruction par méthode de référence seule comparée à la méthode référence couplée à la maximisation de correspondance. . . . .	150
3.40	Estimation de la dérive de la phase de la reconstruction par maximisation de la correspondance. . . . .	151
3.41	Utilisation d'un filtre passe-haut pour la synchronisation fine par maximum de correspondance. . . . .	152
3.42	Caractérisation de la précision de la reconstruction par les deux méthodes combinées. . . . .	154
3.43	Courbes relatives du déphasage normalisé entre les trois images indépendantes reconstruites. . . . .	155
3.44	Influence des apériodicités sur le repliement des kymogrammes. . . . .	156
3.45	Repliement de cycles lors d'une augmentation de la fréquence cardiaque par échauffement. . . . .	157
3.46	Effet du repliement du cycle cardiaque et récupération du RSB par débruitage.	159
3.47	Analyse fréquentielle de l'étape de débruitage. . . . .	161
3.48	Reconstruction d'une image en fluorescence, SHG et THG. . . . .	163

3.49	Acquisition 3D du cœur arrêté en SHG . . . . .	164
3.50	Caractérisation des sarcomères à partir d'une acquisition statique. . . . .	165
3.51	Caractérisation statique des sarcomères à partir d'une acquisition dynamique. . . . .	166
3.52	Quantification dynamique de la distance inter-sarcomère au cours d'un cycle de contraction. . . . .	167
3.53	Imagerie SHG du cœur arrêté de mutant Desmin dynamiquement . . . . .	168
3.54	Imagerie SHG 3D du cœur de mutant Desmin dynamique, à 1000 Hz . . . . .	169
3.55	Phénomène de flambage observé sur certaines fibres du muscle cardiaque chez le Desmin. . . . .	170
3.56	Acquisition XTYZ du cœur à 4 canaux. . . . .	170
3.57	Image SHG et fluorescence du cœur 3D d'une valve cardiaque, 800 Hz . . . . .	172
3.58	Image SHG/fluorescence du cœur présentant les deux valves cardiaques. . . . .	173
3.59	Caractérisation de la vitesse de fermeture des valves cardiaques, 1200 Hz . . . . .	174
3.60	Embryon de poulet à 48h de développement en lumière blanche. . . . .	175
3.61	Acquisitions statiques du cœur arrêté de poulet. . . . .	178
3.62	Acquisitions dynamiques du cœur poulet . . . . .	179
3.63	Exemple de déformation temporelle utile à la gestion des arythmies non-linéaires	181
3.64	Principe de l'illumination en champ sombre . . . . .	183
3.65	Effet de l'orientation de polarisation sur le signal SHG des sarcomères . . . . .	184
3.66	Montage expérimental pour l'observation du cœur de poisson-zèbre adulte <i>ex vivo</i> sous le TriMScope. . . . .	185
3.67	Acquisition SHG sur cœur adulte arrêté <i>ex vivo</i> , en épi-détection et en transmission . . . . .	186
3.68	Imagerie XTY à 800 Hz d'un cœur dont les rapporteurs calciques sont marqués	187
3.69	Tentative de reconstruction d'un cil cellulaire motile par la méthode XTY à 1200 Hz . . . . .	189

# Introduction

Les oscillateurs biologiques régissent le vivant à toutes les échelles temporelles et spatiales : de la fraction de seconde des impulsions neuronales jusqu'à l'année entière des rythmes saisonniers, de nombreux processus sont ainsi régulés par le phénomène d'oscillation. Parmi eux, le cil motile et le coeur battant sont deux systèmes biologiques très étudiés en biologie du développement, qui partagent ce point commun de présenter tous deux un mouvement périodique dans le temps et l'espace, à des échelles similaires. Dans ce manuscrit, nous nous proposons de les étudier dynamiquement, à l'aide de l'imagerie *in vivo* chez l'embryon de poisson-zèbre, un organisme modèle du développement des vertébrés. Pour ce faire, nous utiliserons la propriété de périodicité de ces processus biologiques, afin de développer des stratégies innovantes d'imagerie rapide en microscopie multiphoton. L'objectif est alors d'en résoudre le mouvement dynamiquement, tridimensionnellement, avec une précision temporelle et spatiale suffisante à leur observation.

Le cil cellulaire d'abord, est une extension cytoplasmique que l'on retrouve dans presque toutes les cellules eucaryotes, dont le rôle est de générer un flux biologique lorsqu'il est motile, ou d'assurer une fonction sensorielle. Au cours des dernières années, leurs dysfonctionnements ont été identifiés dans un nombre croissant de pathologies, regroupées sous le terme de ciliopathies. Ces organites en forme d'antenne de quelques micromètres de long peuvent battre rapidement, de l'ordre de plusieurs dizaines de fois par seconde, et de manière périodique. En particulier, ils sont impliqués dans la brisure de symétrie gauche-droite chez les vertébrés, dernier axe biologique à se spécifier au cours du développement. Chez le poisson-zèbre, ils sont présents en nombre à la surface de la cavité responsable de l'établissement de cette polarité gauche-droite, appelée vésicule de Kupffer. Ils y génèrent un flux directionnel par battement organisé, qui brise la symétrie gauche-droite.

Le coeur est également un sujet d'étude très actif en biologie du développement. La compréhension de la dynamique du battement de cette pompe biologique reste un enjeu majeur. Chez l'embryon de poisson-zèbre, il mesure plusieurs centaines de micromètres, et bat plusieurs fois par seconde. Ainsi, la visualisation du muscle cardiaque battant *in vivo* demeure un défi en microscopie rapide, de par sa taille, la finesse de ses structures et la vitesse à laquelle elles se déplacent.

De par les similitudes des échelles temporelles et spatiales de ces processus périodiques, ils présentent des défis expérimentaux analogues. En particulier, la microscopie multiphoton de fluorescence ou d'harmonique, permet l'imagerie volumique en profondeur de ces structures, avec une précision subcellulaire. Cependant, les modalités classiques d'imagerie ne permettent pas d'en résoudre dynamiquement les mouvements rapides. En effet, pour être observés en mouvement, ces derniers nécessitent des vitesses d'imagerie bien au-delà de ce que les techniques actuelles, même optimisées pour la vitesse, sont en mesure de fournir. Dans ce manuscrit, nous proposons de contourner ces limitations techniques par le développement de stratégies originales d'imagerie, de traitement et d'analyse d'images, se basant sur les propriétés périodiques des cils motiles et du coeur battant.

Dans le Chapitre 1, nous présenterons tout d'abord le contexte des oscillateurs biologiques et les spécificités associées à l'étude des cils et du coeur. Nous introduirons ensuite la technique utilisée à l'observation de ces deux structures : la microscopie multiphoton de fluorescence et d'harmonique, plus spécifiquement appliquée à l'étude des processus biologiques. Enfin, nous présenterons les enjeux de vitesse associés à l'imagerie dynamique de nos deux modèles, les limitations des techniques actuelles et la solution que nous proposons, basée sur le caractère périodique de leur battement respectif.

Le Chapitre 2 concernera ensuite l'étude des cils cellulaires motiles au cours de la spécification de l'axe gauche-droite aux stades précoces de développement, chez l'embryon de poisson-zèbre. Dans cette partie, nous établirons les enjeux biologiques associés à la brisure de symétrie au sein de l'organisateur gauche-droite du modèle : la vésicule de Kupffer. Nous contournerons les limitations de vitesse liées à l'imagerie multiphoton point par point, en tirant avantage de la périodicité par la caractérisation des artefacts de balayage qu'elle génère. Grâce à cela, nous avons développé une chaîne de traitement et d'analyse systématique des cils de la vésicule de Kupffer, 3D-CiliaMap, dont nous détaillerons le fonctionnement et les performances. Finalement, nous illustrerons l'application de cette approche à l'aide de plusieurs résultats biologiques obtenus par l'analyse quantitative et systématique des données collectées.

Le Chapitre 3 présentera enfin le développement d'une nouvelle approche d'imagerie rapide de phénomènes périodiques, ici appliquée à l'étude du coeur : l'imagerie XTYZ. La méthode se base sur la synchronisation a posteriori de séquences en ligne balayées rapidement, permettant de reconstruire des volumes avec une résolution temporelle effective sans précédent, de l'ordre de 1000 volumes par seconde, et sans compromettre les autres performances du microscope. Par celle-ci, nous détaillerons comment nous sommes parvenus à résoudre le mouvement cardiaque dynamiquement et tridimensionnellement, en particulier via un mode de contraste spécifique des fibres musculaires : la génération de seconde harmonique (SHG). Au cours de ce chapitre, nous quantifierons les performances de la méthode, et présenterons des résultats d'imagerie à l'étude notamment de la contraction des fibres du muscle cardiaque *in vivo*, avec une résolution temporelle et spatiale inédite.

# Chapitre 1

## Microscopie multiphoton pour l'imagerie du vivant

### Sommaire

---

<b>1.1</b>	<b>Introduction aux oscillateurs biologiques</b>	<b>4</b>
1.1.1	Générer des oscillations	4
1.1.2	Échelles temporelles et spatiales des oscillations	5
1.1.3	Deux oscillateurs biologiques : du cœur battant au cil motile	5
<b>1.2</b>	<b>Imagerie pour la biologie</b>	<b>7</b>
1.2.1	Techniques d'imagerie du vivant	7
1.2.2	Microscopie optique	7
1.2.3	Microscopie multiphoton	8
1.2.4	Microscopie de fluorescence excitée à 2 photons pour la biologie	15
1.2.5	La microscopie SHG et THG pour la biologie	16
1.2.6	La microscopie multiphoton pour imager les cils et le coeur	18
<b>1.3</b>	<b>Imager plus vite</b>	<b>19</b>
1.3.1	Résolutions spatiale et temporelle : le grand compromis?	19
1.3.2	Imagerie dynamique : quelle résolution temporelle?	19
1.3.3	État de l'art de la vitesse d'imagerie	21
<b>1.4</b>	<b>Stratégies d'imagerie pour l'étude de phénomènes périodiques</b>	<b>30</b>
<b>1.5</b>	<b>Références</b>	<b>30</b>

---



## 1.1 Introduction aux oscillateurs biologiques

Le monde vivant est un système autonome. À toutes les échelles temporelles et spatiales, les êtres vivants ont trouvé les moyens de s'organiser et de se réguler par eux-même. Les oscillateurs biologiques en sont une manifestation frappante mais surtout essentielle, qui jouent un rôle critique dans l'établissement d'un nombre important de processus régissant les rythmes du vivant. De la journée du rythme circadien (figure 1.3) à la milliseconde des oscillations neuronales, en passant par les quelques minutes caractéristiques des cycles métaboliques ou hormonaux, les oscillations sont omniprésentes et permettent une régulation dans le temps ou l'espace, des systèmes biologiques autour d'états d'équilibres.

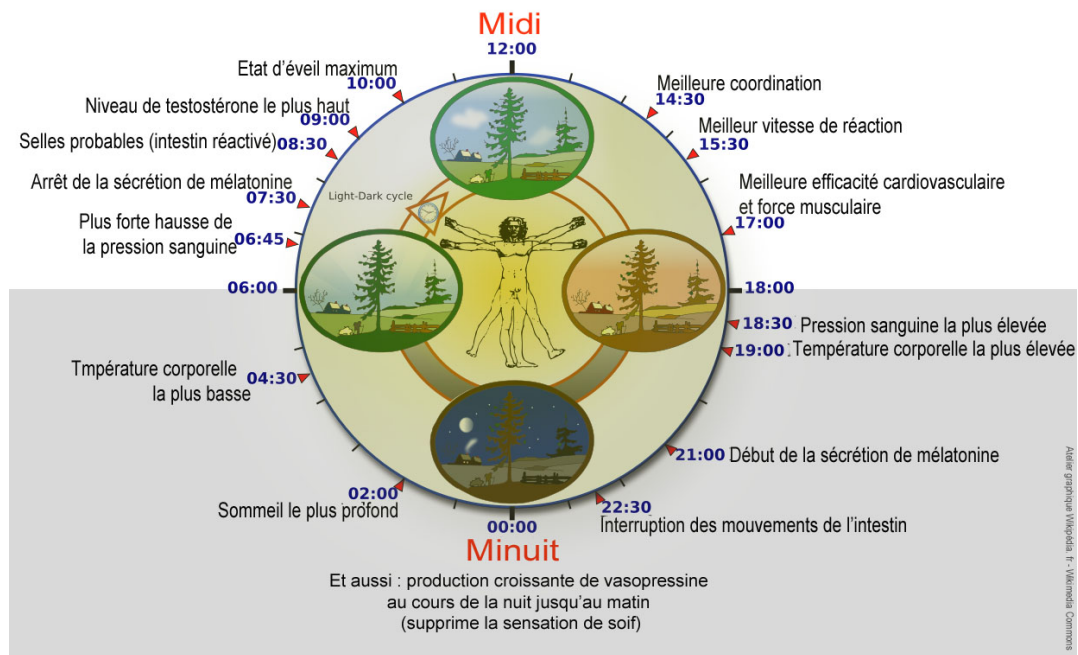


FIGURE 1.1: Exemple d'un oscillateur biologique : le rythme circadien. D'une durée d'environ 24 heures, le cycle circadien correspond notamment au rythme veille-sommeil, mais régule en réalité de nombreux autres mécanismes biologiques, physiologiques et comportementaux chez l'être humain. Tiré de Wikipedia.

### 1.1.1 Générer des oscillations

Bien que les processus de régulations biologiques soient pour la plupart très différents les uns des autres, notamment aux différentes échelles auxquelles elles se manifestent, il existe des éléments critiques communs à la génération d'oscillations. D'abord observés empiriquement puis analysés quantitativement depuis des décennies [1–4], un cadre mathématique a finalement été développé dans les années 1970 pour permettre de comprendre l'émergence de ces phénomènes oscillatoires au sein des systèmes biologiques [5–7].

On distingue alors 5 facteurs critiques assurant non-seulement la génération mais aussi la modulation et la robustesse des oscillations biologiques. Ils sont les éléments suivants :

- **Un système de rétroaction négative** (*negative feedback*), visant à atténuer les fluctuations de la sortie du système en la réinjectant négativement sur l'entrée. Ces contre-réactions ont pour but de stabiliser le système autour d'un état d'équilibre : c'est le phénomène d'homéostasie ;
- **Un système de rétroaction positive** (*positive feedback*), visant cette fois à amplifier les signaux d'entrée en les réinjectant positivement ;

- **Un retard temporel de la rétroaction** (*time delay*), afin réguler l'inertie de réinjection du signal. C'est un paramètre déterminant à l'apparition d'oscillations.
- **Du bruit**, qui bien que nuisible à la génération d'oscillations dans la majeure partie des cas, peuvent en être la source sous certaines conditions ;
- **Une non-linéarité de la rétroaction**, agissant comme une modulation du retard temporel de la boucle, permettant de moduler l'oscillation en amplitude comme en fréquence.

Ainsi, les oscillations émanent des instabilités propres aux systèmes biologiques, via notamment les boucles de rétroactions. Elles leur permettent leur régulation, et constituent un moyen viable et robuste de fonctionnement au cours du temps. C'est ainsi qu'un nombre important de mécanismes biologiques sont régis par des oscillations, à toutes les échelles temporelles et spatiales.

### 1.1.2 Échelles temporelles et spatiales des oscillations

Les oscillations biologiques se manifestent à toutes les échelles temporelles et spatiales. La figure 1.3 en illustre l'étendue temporelle : d'un côté du spectre, les rythmes saisonniers, comme par exemple la production de fruits d'un arbre, s'étalent sur une année complète. À l'inverse, la dynamique des oscillations neuronales est plutôt de l'ordre du centième de seconde, comme observées par électroencéphalogramme notamment. Ces phénomènes sont pour autant souvent intriqués, et les processus oscillatoires interdépendants à des échelles drastiquement différentes. C'est notamment le cas des interactions moléculaires et chimiques, dont les oscillations rapides se traduisent à l'échelle du cycle circadien jour-nuit ; entre les deux phénomènes, on peut trouver plus d'une quinzaine d'ordres des grandeurs temporels [8]. Dans l'espace, les oscillations temporelles peuvent aboutir à des mouvements périodiques robustes, dont la génération est également conditionnée par les 5 paramètres décrits à la section précédente. Pour ces travaux de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux modèles dont les échelles d'oscillations temporelles et spatiales sont analogues : le battement du cœur et le mouvement du cil cellulaire. L'un comme l'autre, ils présentent des dimensions de l'ordre de 1 à 100 micromètres spatialement, et de 1 à 100 millisecondes temporellement.

Tableau II	
PRINCIPAUX RYTHMES BIOLOGIQUES ET ÉTAGEMENT DE LEUR PÉRIODE (D'APRÈS [35])	
Rythme	Période
Rythmes neuronaux	0,01 à 10 s (et plus)
Rythme cardiaque	1 s
Oscillations calciques	quelques s à plusieurs min
Oscillations métaboliques (glycolyse)	ordre de la min
Cycle de division cellulaire <sup>1</sup>	10 min à 24 h (et beaucoup plus)
Rythmes hormonaux	10 min à quelques h (et aussi 24 h)
Rythmes circadiens (horloge biologique)	24 h
Cycle ovarien	28 j (dans l'espèce humaine)
Rythmes saisonniers	1 an
Épizooties, épidémies et rythmes écologiques	années

FIGURE 1.2: Les cycles biologiques aux différentes échelles temporelles. Tiré de [9].

### 1.1.3 Deux oscillateurs biologiques : du cœur battant au cil motile

Dans ce manuscrit, nous nous intéressons à deux phénomènes biologiques périodiques aux échelles temporelles et spatiales proches, et présentant des défis expérimentaux similaires. Le

cœur d'abord, est probablement l'un des oscillateurs biologiques les plus évidents : il permet chez les organismes disposant d'un système vasculaire, de pomper de manière périodique le sang au sein des artères et veines qui le composent. L'étude de sa morphogenèse est alors un sujet crucial à la compréhension, chez l'homme en particulier, de la structure du muscle cardiaque aussi bien que du fonctionnement de son battement périodique. Dans cette démarche, nous proposons donc l'étude d'un modèle simplifié du cœur humain : le cœur de poisson-zèbre aux stades précoces.

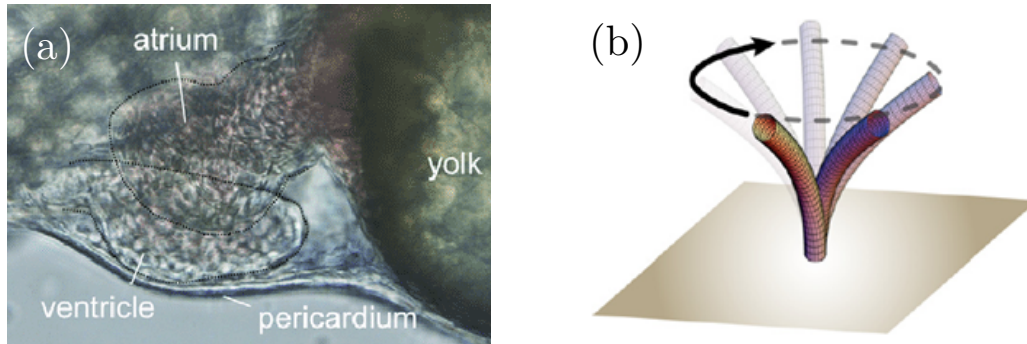


FIGURE 1.3: Les deux oscillateurs biologiques qui seront étudiés dans ce manuscrit. (a) Le cœur battant de l'embryon de poisson-zèbre. (b) Le cil motile, présent en nombre dans l'organisateur gauche-droite de l'embryon de poisson-zèbre et responsable de la spécification de cet axe : la vésicule de Kupffer.

Le second sujet que nous avons choisi d'aborder concerne là encore le domaine de la biologie du développement : il s'agit de l'établissement de la polarité gauche-droite chez les vertébrés, dernier axe biologique à se spécifier au cours du développement embryonnaire. À l'origine de ce phénomène, on trouve un autre oscillateur biologique : le cil cellulaire, un organite microscopique capable de battre de manière périodique et de mettre en mouvement des fluides biologiques. Bien que leur rôle soit moins évident que celui du cœur, les cils cellulaires sont en réalité impliqués dans un nombre impressionnant de mécanismes biologiques cruciaux, en particulier celui de la brisure de symétrie gauche-droite chez les vertébrés. À nouveau, nous nous proposons d'étudier leur fonctionnement chez un organisme modèle pratique à leur observation : l'embryon de poisson-zèbre.

Leur fonctionnement ainsi que leur rôle au sein de l'organisme est très différent. Toutefois, ces deux oscillateurs présentent un point commun de taille : ils opèrent à des échelles temporelles et spatiales analogues. Le cœur de poisson-zèbre d'abord, est un organe qui mesure quelques centaines de micromètres au stade précoce [10] et qui bat périodiquement à une fréquence de l'ordre du hertz. Cependant, pour permettre une étude approfondie du muscle cardiaque, il faut par ailleurs considérer les structures élémentaires qui le composent : les sarcomères, les briques élémentaires des fibres musculaires, de l'ordre du micromètre. Le cil cellulaire motile quant à lui, présente une taille typique de quelques micromètres pour une fréquence de battement de l'ordre de quelques dizaines de hertz [11]. Ainsi, les vitesses de ces deux phénomènes sont elles aussi analogues, toutes deux au voisinage de quelques centaines de micromètres par seconde. De manière générale, ces deux modèles ne sont pas des cas isolés d'oscillateurs biologiques : il existe de nombreux autres phénomènes périodiques présentant des échelles semblables à ceux-ci. À titre d'exemple, on peut citer notamment le battement rapide des ailes de la drosophile [12; 13] à des fréquences de plusieurs centaines de hertz, ou encore l'aspiration périodique de liquide par le moustique [14] (quelques hertz à des vitesses de plusieurs centaines de micromètres par seconde). Le bilan est alors que leur étude respective peut être abordée au moyen de techniques similaires, permettant de capturer leurs mouvements à ces dimensions temporelles et spatiales.

Dans ce manuscrit, nous nous proposons d'étudier ces mouvements périodiques hautement dynamiques *in vivo*, à des échelles micrométriques, en profondeur et en trois dimensions de l'espace. Pour répondre à ces impératifs et permettre l'observation de ces modèles, nous utiliserons la **microscopie multiphoton**. La technique est adaptée à ces échelles et permet l'imagerie en profondeur dans les tissus biologiques, pertinente à l'étude de problématiques de biologie du développement. Comme nous le verrons dans la suite, ce type de méthode permet une visualisation par contraste de fluorescence, mais aussi la génération de signaux d'harmoniques, pertinente à l'imagerie du cœur. Toutefois, et comme il le sera détaillé dans la section suivante, les méthodes qui existent à ce jour ne disposent pas de la vitesse d'imagerie nécessaire pour résoudre temporellement les mouvements décrits plus haut. Nous présenterons donc finalement les stratégies développées au cours de ces travaux de thèse, permettant de contourner ce problème : l'utilisation de la propriété de périodicité des phénomènes étudiés, afin d'en permettre la visualisation.

## 1.2 Imagerie pour la biologie

### 1.2.1 Techniques d'imagerie du vivant

Du fait de sa large variété de structures, d'échelles et de contraintes, imager le vivant n'est pas une mince affaire. Étudier ces phénomènes passe bien souvent par une étape de visualisation, indispensable à la bonne compréhension des procédés biologiques qui régissent les organismes vivants. Au cours du siècle dernier, ont été développés toute une panoplie d'outils qui visent à visualiser le plus grand nombre de ces processus. Chacune de ces techniques présente des avantages et des limitations différentes, qu'il convient de considérer en fonction de l'application. C'est dans leur utilisation complémentaire que l'on parvient répondre à la plupart des contraintes d'imagerie de ces objets biologiques. L'un des plus récurrents compromis oppose la résolution à la profondeur d'imagerie dans les tissus (figure 1.4).

Les techniques d'imagerie médicales comme l'IRM disposent d'une résolution modérée (de l'ordre de 1 mm), mais jouissent d'une excellente profondeur d'imagerie qui permet de visualiser l'intégralité du corps humain. À l'inverse, certains microscopes électroniques permettent des résolutions inférieures à la fraction de nanomètre (0.1 nm), mais sont limités à l'étude d'échantillons très fins, souvent fixés par procédés chimiques ou vitrifiés à l'état natif. La microscopie optique fait office de solution intermédiaire, qui concilie une bonne résolution spatiale (de l'ordre de 0.1 à 1  $\mu\text{m}$ ) à une profondeur de pénétration adaptée à l'étude de tissus biologiques, en particulier *in vivo* (quelques centaines de micromètres). C'est une technique de choix à l'étude de la morphogenèse, de par son caractère non-invasif et la précision des images qu'elle est capable de fournir.

### 1.2.2 Microscopie optique

La microscopie optique s'est développée au XVI<sup>ème</sup> siècle, avec l'apparition des premiers microscopes plein champ par Hans Janssen et Zacharias Janssen puis Antoni van Leeuwenhoek un siècle plus tard. Animés par la volonté de comprendre le vivant, les avancées techniques ont mené les scientifiques de ces 5 siècles derniers à développer des méthodes toujours plus performantes d'illumination (avec l'apparition des lasers), d'optiques ainsi que de nouveaux modes de contrastes. Le développement de la microscopie à fluorescence au début du XX<sup>ème</sup>, avec notamment l'avènement des marqueurs encodés génétiquement (protéines type GFP), ont permis à la technique de connaître un essor important. L'apparition de la microscopie confocale, développée par Marvin Minsky en 1957, a ouvert une brèche dans le monde de l'imagerie *in vivo*, en permettant un sectionnement optique jusque-là jamais observé. Tirant profit de la spécificité du marquage par fluorescence et permettant de sélectionner le plan de

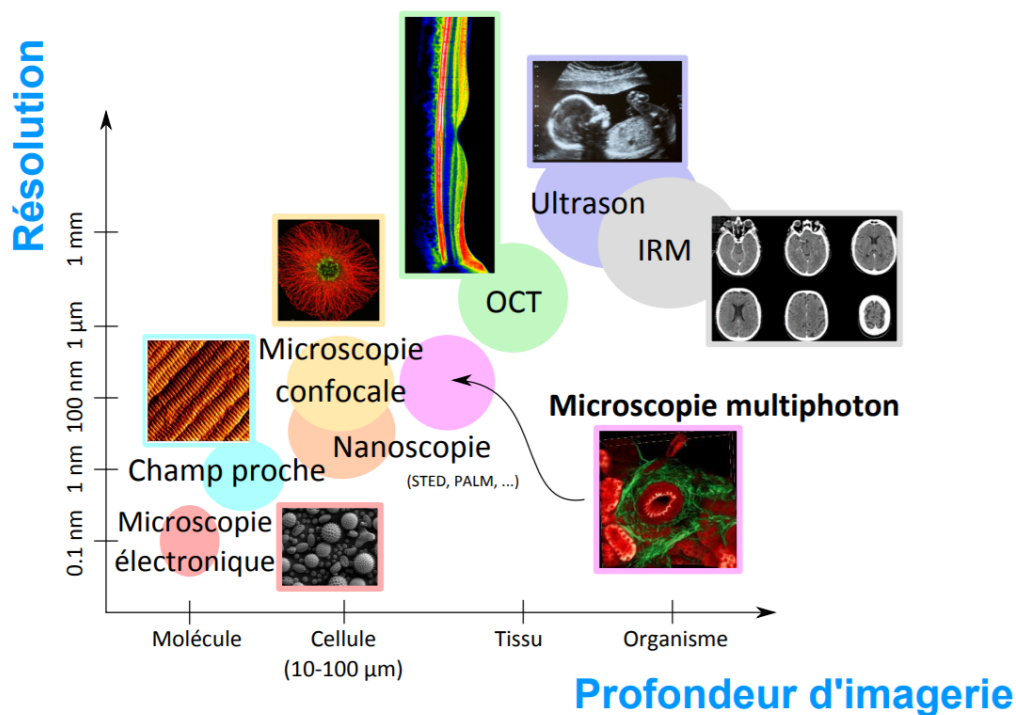


FIGURE 1.4: Aperçu des différentes techniques d'imagerie biologique et de leur positionnement vis à vis du compromis résolution/pénétration. Les techniques qui présentent les meilleures résolutions ne permettent pas d'imager profondément dans les tissus, et réciproquement. Tiré de [15].

mise au point, s'est progressivement développée l'imagerie 3D, puis 4D (3D dans le temps), qui sont autant d'outils indispensables à la compréhension de phénomènes à l'étude aujourd'hui.

La microscopie de fluorescence est aujourd'hui la technique de référence à l'imagerie d'organismes vivants, grâce à son excellente résolution spatiale sur des volumes tridimensionnels relativement importants. Cette technique est aujourd'hui plus que jamais un sujet actif de recherche, et de nouveaux développements récents continuent d'émerger, à l'exemple de la microscopie à nappe de lumière ou la microscopie spinning-disk (figure 1.5).

## 1.2.3 Microscopie multiphoton

### 1.2.3.1 Principes généraux

L'un des dérivés de la microscopie confocale classique est la microscopie multiphoton, proposée par Denk et al. [17] en 1990. Elle regroupe tous les processus d'optique non-linéaire [18; 19], aussi appelés processus multiphotons. Cette technique a apporté de nouvelles perspectives à la microscopie à fluorescence, en facilitant l'imagerie tridimensionnelle dans les tissus épais et en proposant de nouveaux modes de contrastes sans marquages. La microscopie multiphoton utilise les propriétés non-linéaires des échantillons : il existe ainsi toute une variété de modes de contrastes différents, cohérents ou non, complémentaire de la microscopie confocale à 1 photon. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux modalités d'imagerie : la microscopie à fluorescence excitée à 2 photons (2PEF), et la génération de seconde (SHG) et troisième harmonique (THG) :

- **Microscopie à fluorescence excitée à 2 photons (2PEF)** : cette technique repose sur le principe de l'excitation d'un fluorophore par absorption simultanée de deux photons. Pour cela, leur énergie doit être deux fois plus faible que celle requise au

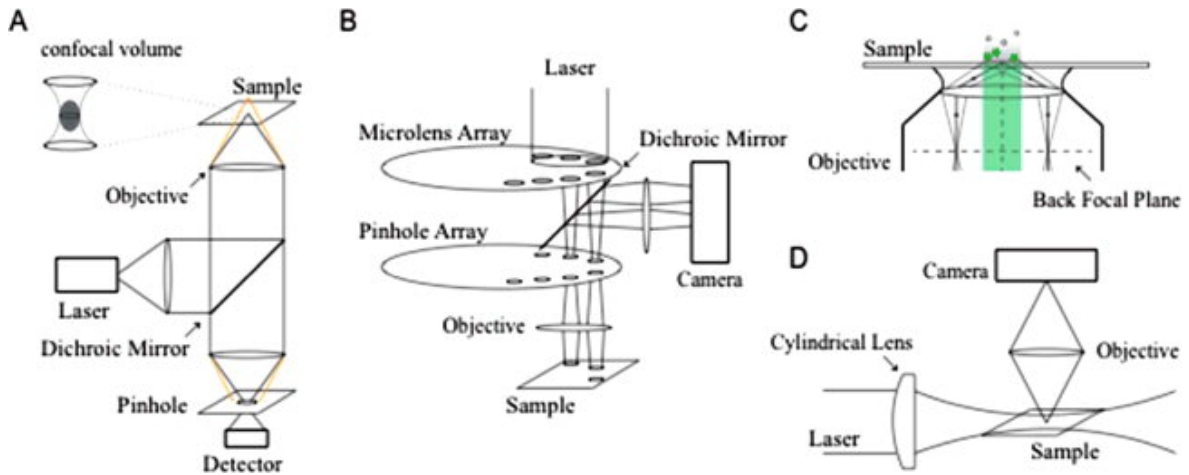


FIGURE 1.5: Principales techniques de microscopie à fluorescence. **A** Microscopie confocale, **B** Microscopie Spinning-disk, **C** Microscopie par réflexion totale interne (TIRF), **D** Microscopie à nappe de lumière (SPIM). Tiré de [16].

fluorophore pour passer dans un état excité. Ce dernier, en se relaxant vers son état fondamental, générera un unique photon incohérent d'énergie double, donc de longueur d'onde deux fois moindre que les photons d'excitation. Le processus se généralise avec un nombre  $n$  de photons plus important.

- **La génération de seconde et troisième harmonique** : c'est un phénomène de diffusion inélastique, non résonant, lié à la nature non-linéaire intrinsèque des structures illuminées. Deux (resp. trois) photons vont interagir au sein du matériau pour former un nouveau photon d'énergie double (resp. triple), cette fois cohérent avec l'excitation.

La (figure 1.6) détaille les diagrammes de Jablonski simplifiés, résumant les interactions photoniques possibles au sein des différents processus.

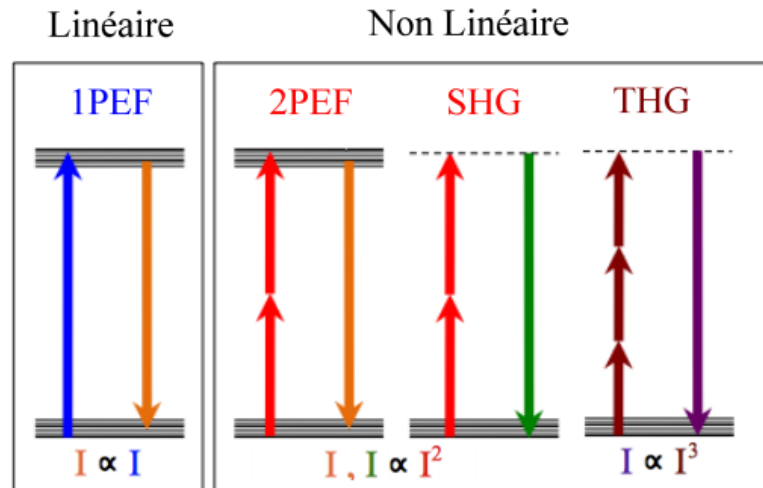


FIGURE 1.6: Diagrammes de Jablonski pour les modes de contrastes linéaires et non linéaires. Fluorescence excitée à 1 photon (1PEF); Fluorescence excitée à 2 photons (2PEF); Génération de seconde harmonique (SHG); Génération de troisième harmonique (THG). Adapté de [20].

**Excitation multiphoton** La probabilité d'occurrence des phénomènes non-linéaire est faible, d'autant plus qu'elle implique l'interaction simultanée d'un nombre plus important de photons : c'est l'une des différences majeures avec la microscopie confocale 1-photon.

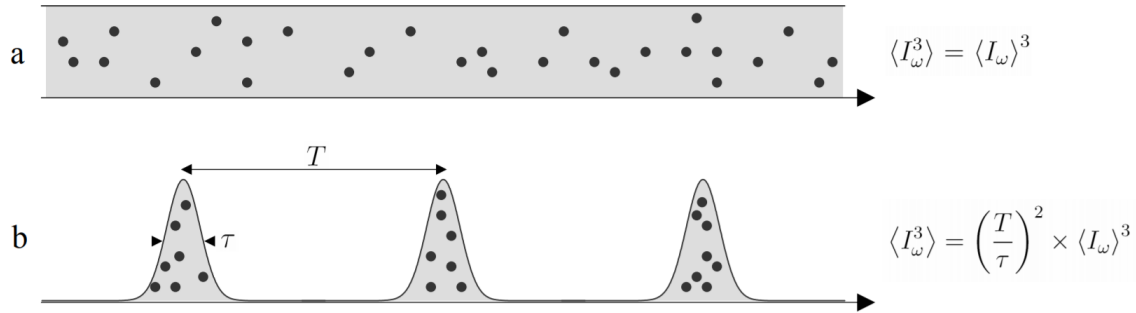


FIGURE 1.7: Comparaison du mode d'excitation par laser continu (a) à une source à impulsions ultrabrèves (b). A intensité moyenne identique, un laser pulsé permet d'obtenir un signal THG proportionnel au carré de l'inverse rapport cyclique des impulsions. Tiré de [21].

Cette singularité nécessite une approche différente de l'excitation de l'échantillon. En effet, afin de s'assurer de l'interaction simultanée de plusieurs photons incidents au sein du volume excitation (donc de générer du signal), il est impératif de densifier la population photonique en un point donné. L'intensité du signal à  $n$  photons  $I_n$  est lié à l'intensité d'excitation  $I_{ex}$  par la relation :  $I_n \propto I_{ex}^n$ . De fait, il est crucial de maximiser l'intensité instantanée d'excitation, pour augmenter les chances d'interactions entre plusieurs photons et ainsi tirer profit de la non-linéarité des signaux émis. Pour ce faire, il convient d'utiliser des sources à impulsion très brèves mais très puissantes. Cela revient à concentrer temporellement le flux de photons, sans pour autant augmenter la puissance moyenne reçue par l'échantillon biologique. La figure 1.7 témoigne des gains obtenus pour un système à trois photons par l'utilisation d'impulsions ultra-courtes, par rapport à un laser continu à même puissance moyenne.

Dans le cas de la génération de seconde harmonique, un phénomène non-linéaire du deuxième ordre, le signal collecté sera donc proportionnel au carré de l'intensité  $I_\omega^2$ , à chaque instant. Pour un laser continu, la puissance moyenne émise au cours du temps  $\langle I_\omega^2 \rangle$  est naturellement proportionnelle à la puissance émise en chaque instant  $\langle I_\omega \rangle^2$ . Dans la configuration non-linéaire, on peut écrire la relation suivante, liant la durée des impulsions  $\tau$ , le taux de répétition du laser  $T^{-1}$  et les intensités moyennes du signal incident et généré :

$$\langle I_\omega^2 \rangle = \left(\frac{T}{\tau}\right) \times \langle I_\omega \rangle^2 \quad (1.1)$$

Typiquement, l'excitation non-linéaire ou multiphoton s'effectue au moyen d'un laser pulsé dont les temps d'impulsions avoisinent les 100 fs, pour un taux de répétition de 100 MHz. D'après 1.1, cela correspond à un gain d'intensité de l'ordre de  $10^5$  sur une source continue. Dans la pratique, la puissance moyenne n'est pas l'unique paramètre à considérer afin de limiter la phototoxicité de l'illumination. En effet, la puissance crête, le taux de répétition et la durée des impulsions sont autant de variables qui peuvent provoquer des dommages, linéaires ou non-linéaires à l'échantillon.

### 1.2.3.2 Propriétés

De nombreux avantages émanent de la nature non-linéaire des signaux impliqués. Dans la section ci-dessous, on remarquera l'intérêt de la technique à l'étude de phénomènes biologiques. La microscopie multiphoton permet de s'affranchir de certains écueils inhérents à la microscopie confocale classique et en fait une technique de choix pour imager profondément dans les tissus tout en préservant l'intégrité des échantillons biologiques.

**Sectionnement optique intrinsèque** L'illumination des échantillons non-linéaires par impulsions ultra-brèves décrite figure 1.7 confère naturellement à la technique un confinement spatial du volume d'excitation. Le signal non-linéaire émis ne provient que des zones de fortes densités de photons et permet donc un sectionnement optique, auparavant obtenu au moyen d'un diaphragme en microscopie confocale 1-photon. De fait, il est possible de cartographier un échantillon épais, en acquérant séquentiellement des coupes sous forme d'image 2D, pour ensuite les assembler et reconstituer le volume tridimensionnel. Par ailleurs, et comme l'illustre la figure 1.8, l'échantillon n'est excité dans le visible que très localement. Au-delà de l'intérêt d'exciter uniquement la zone d'intérêt d'imagerie, la détection tire profit du confinement. En effet, ne seront collectés puis détectés que les photons issus du volume focal : on s'affranchit alors du bruit issu de la diffusion de photons excités puis collectés hors du plan focal.

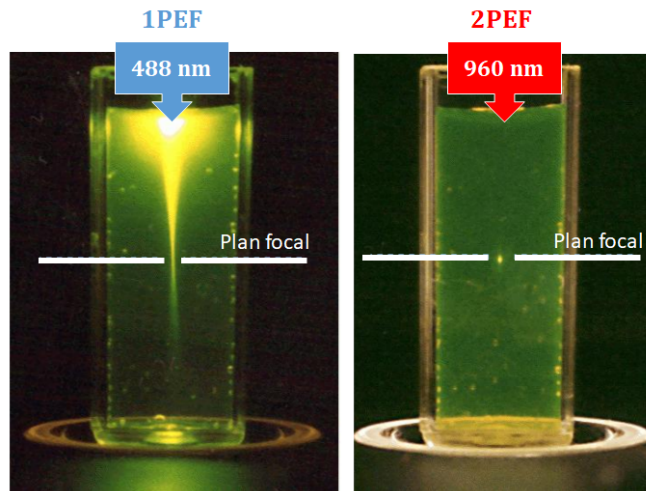


FIGURE 1.8: Confinement du volume focal. Comparaison de l'excitation à 1-photon à 488 nm et 2 photons à 960 nm, d'une solution de fluorescéine. Adapté de [22]

**Résolution spatiale** Le confinement spatial de l'excitation multiphoton permet également un gain de résolution. Comme exprimé précédemment, pour un processus d'ordre  $n$ , il faut l'interaction concomitante de  $n$  photons pour générer du signal. Dans ces conditions, plus on s'éloigne du point de focalisation du faisceau, moins on émettra de photons ; d'autant plus que l'ordre  $n$  est élevé. Dans le cas d'un faisceau Gaussien-Gaussien, les approximations analytiques de la résolution latérale et axiales donnent les relations suivantes [23] :

$$\delta_{xy,n} = \frac{0.61\lambda}{\sin \theta \sqrt{n}} \quad (1.2)$$

$$\delta_{z,n} = \frac{0.894\lambda}{(1 - \cos \theta) \sqrt{n}} \quad (1.3)$$

où  $\delta$  correspond à la largeur à mi-hauteur de la PSF et  $\theta$  le demi-angle d'ouverture du faisceau incident.

On remarque d'abord la contribution des effets non-linéaires d'ordre  $n$ , qui comme attendus, améliorent la résolution d'un facteur  $\sqrt{n}$ . Il est cependant important de rappeler que l'excitation multiphoton se fait principalement dans le proche infrarouge, à des longueurs d'onde environ deux fois plus importantes qu'en 1-photon. Les relations précédentes suggèrent alors une perte non négligeable de résolution, avec la dépendance linéaire en  $\lambda$ . Cependant, lors de la comparaison des deux techniques, il est important de prendre en considération la dégradation du faisceau et donc de la résolution, dans les tissus biologiques. Dans ce domaine,



la microscopie multiphoton supplante largement son équivalent à 1 photon et permet alors de meilleures résolutions spatiales en profondeur. Numériquement, pour les applications typiques et pour des ouvertures numériques proches de 1, on obtient des valeurs approximatives de l'ordre de 0.3 à 0.4  $\mu\text{m}$  en latéral et de 1 à 2  $\mu\text{m}$  en axial. Ces chiffres sont à comparer à la taille typique d'une cellule, qui avoisine la dizaine de microns.

**Photoblanchiment** L'un des problèmes communs à la microscopie à fluorescence concerne le photoblanchiment, c'est-à-dire la perte de fluorescence d'une molécule excitée de manière répétée. Lors de l'excitation vers un état d'énergie haut, le fluorophore peut se comporter de deux manières distinctes. La première est la désexcitation de la molécule par réémission d'un photon : c'est le processus de fluorescence. La seconde est lorsque que la molécule s'engage dans une réaction photo-chimique qui va alors l'empêcher de se désexciter : c'est le photoblanchiment. Ainsi, on observe une perte du signal de fluorescence de la structure concernée par le phénomène. Ici encore, le confinement du volume focal de l'illumination multiphoton permet de limiter le photoblanchiment. Seul les fluorophores présents au plan focal seront excités et donc potentiellement photo-blanchis. Dans le cas à 1 photon et comme visualisé à la figure 1.8, c'est toute la zone illuminée qui sera affectée par le phénomène, proportionnellement à l'intensité de l'excitation.

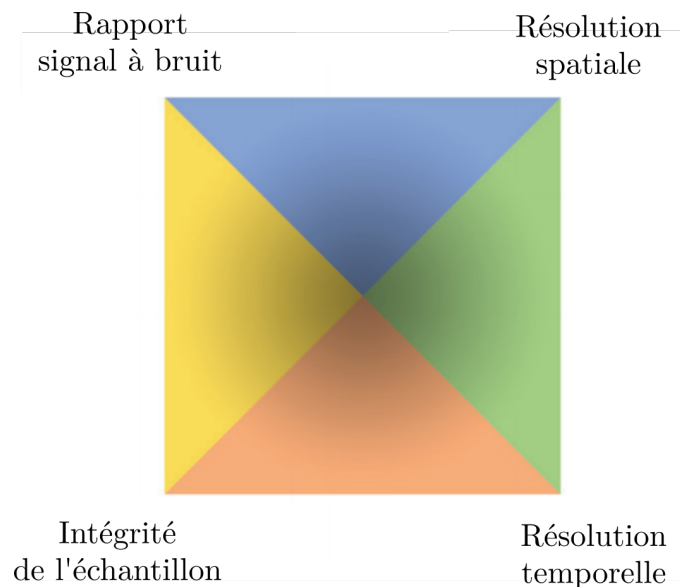


FIGURE 1.9: Illustration des compromis à effectuer lors de l'imagerie *in vivo* d'échantillons biologiques. Aussi connue sous le nom de "Pyramide de la frustration". Tiré de [24].

**Phototoxicité** La dernière spécificité de cette modalité d'imagerie concerne les dégâts photo-induits par la lumière sur l'échantillon biologique. La technique réduit là encore les dommages linéaires portés aux tissus : les longueurs d'onde excitatrices (proche infrarouge, dans la gamme de 700 à 1300 nm) possèdent la propriété d'être largement moins absorbées par les milieux biologiques que le visible (figure 1.11). Là encore, on notera que les photodommages induits ne peuvent l'être qu'au plan de focalisation, par confinement de l'excitation. Il faut cependant signifier que l'on peut également provoquer des dégâts non-linéaires qui sont dus aux fortes puissances crêtes des impulsions auxquelles sont soumis les échantillons. La phototoxicité est un des aspects encore souvent négligé en microscopie moderne au profit de paramètres plus quantitatifs, comme la résolution spatiale ou le Rapport Signal à Bruit (RSB) (figure 1.9). Peu d'études en établissent sa portée et ses effets sur l'imagerie [24] ; il convient alors d'être attentif aux signes visibles de dommages biologiques : accélération du rythme cardiaque, dommages cellulaires, apoptose, bulles, etc., lors des acquisitions.

### 1.2.3.3 Imager en profondeur

Les tissus biologiques sont des milieux hostiles à la bonne propagation d'un faisceau excitateur et a fortiori des photons générés : ce sont des milieux turbides (diffusant et absorbant) pour la lumière. Les propriétés de pénétration de l'illumination multiphoton énoncées précédemment permettent cependant l'observation des échantillons sur une grande profondeur. Comme illustré par la figure 1.10, l'excitation multiphoton confère un avantage de profondeur d'imagerie non négligeable sur la méthode à 1 photon.

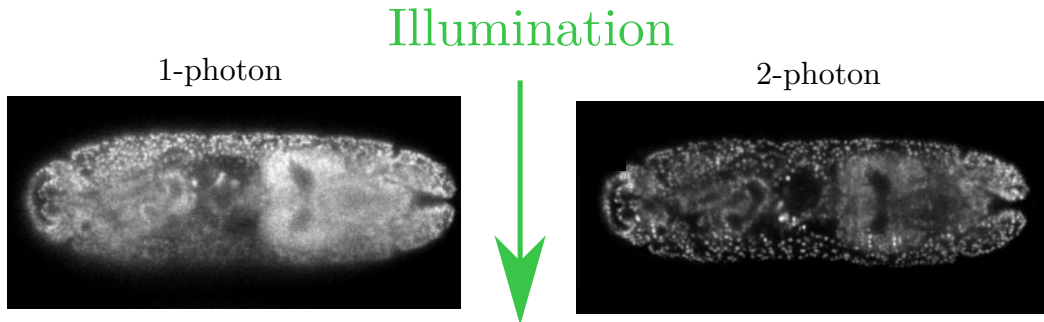


FIGURE 1.10: Profondeur de pénétration de l'illumination 2-photon, ici pour l'imagerie d'un embryon de drosophile en microscopie à nappe de lumière. L'excitation vient du dessus, et on collecte l'image orthogonalement à l'illumination. La résolution est vite dégradée dans la direction d'illumination pour le faisceau 1-photon : il pénètre moins bien les tissus que celui en 2-photon. Tiré de [25].

Dans cette section, on abordera les différentes altérations possibles du signal et leur influence sur la qualité de l'excitation, comme de la détection.

**Conserver le sectionnement optique** Le sectionnement optique induit par la nature non-linéaire de l'illumination est robuste avec la profondeur. En effet, le libre parcours moyen de diffusion, qui correspond à la distance moyenne parcourue par un photon entre deux événements de diffusion, est nettement plus grand dans l'infrarouge (100 à 200  $\mu\text{m}$ ) que dans le visible (30 à 100  $\mu\text{m}$ ). Ainsi, on peut trouver deux explications à la conservation du sectionnement :

La première est que les photons diffusés à l'excitation ne contribuent pas à l'illumination. En clair, la diffusion dans les tissus des photons n'induit pas de réponse du fluorophore : cela nécessite l'interaction de plusieurs photons simultanés, ce qui ne se produit qu'au volume focal. La diffusion induit alors une perte de signal, mais pas de confinement.

La seconde est à mettre en perspective avec la microscopie confocale, qui utilise un diaphragme pour rejeter les photons qui ne sont pas issus du plan de focalisation. La diffusion peut alors guider les photons excités hors du volume focal, leur donnant alors une trajectoire qui semble en provenir. Ces photons peuvent contribuer à la détection et altérer le signal. L'inverse est aussi possible : la diffusion modifie la trajectoire des photons du plan focal, qui seront ensuite rejetés par le diaphragme. En microscopie multiphoton, tous les photons sont collectés et assurés de provenir du volume focal, contribuant donc au signal.

**Absorption** L'absorption est un aspect fondamental qui contribue à l'attrait de la microscopie multiphoton pour les enjeux biologiques. L'absorption d'un milieu est décrite par le libre parcours moyen d'absorption, noté  $l_a$ , qui représente la distance moyenne parcourue par un photon avant d'être absorbé. On le retrouve souvent sous la forme du coefficient d'absorption  $\mu_a = 1/l_a$ . Pour un faisceau lumineux traversant un milieu absorbant, la loi de

Beer-Lambert établit la relation suivant, liant l'intensité incidente et celle dans le milieu à une profondeur notée  $z$  :

$$I(z) = I(z = 0) \cdot e^{-z/l_a} \quad (1.4)$$

L'absorption est une des principales sources d'échauffement du milieu et donc de phototoxicité. C'est aussi une limitation majeure de la microscopie linéaire, qui utilise des longueurs d'ondes d'émissions dans le visible, qui sont très absorbés par les milieux biologiques. La figure 1.11 résume les différents coefficients d'absorption des différents absorbeurs que l'on retrouve dans la plupart des tissus biologiques. On remarque une nette fenêtre d'absorption entre 700 nm et 1300 nm, ce qui correspond aux longueurs d'onde typique d'excitation multiphoton : ceci rend la méthode particulièrement adaptée à l'étude d'échantillons biologiques.

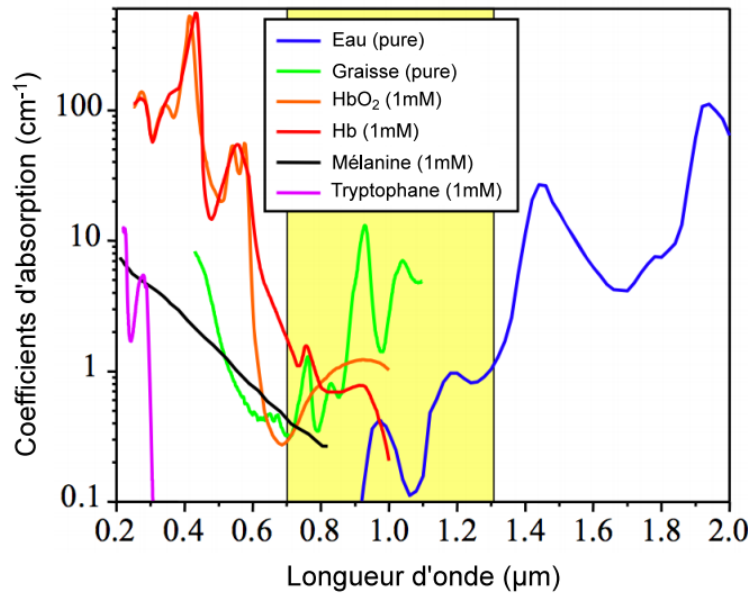


FIGURE 1.11: Courbes d'absorption des différents éléments constitutifs des tissus biologiques. Tiré de [20].

**Diffusion** De manière analogue à l'absorption, on peut définir le libre parcours moyen de diffusion  $l_d$  qui correspond à la distance moyenne entre deux événements de diffusion. On peut alors définir la relation suivante, liant l'intensité de la lumière non-diffusée à une profondeur  $z$  :

$$I(z) = I(z = 0) \cdot e^{-z/l_d} \quad (1.5)$$

De fait, l'un des effets de la diffusion est d'atténuer le signal au niveau du plan focal. Dans la pratique, on note que dans la fenêtre de transparence précédemment évoquée,  $l_a \gg l_d$ , ce qui rend l'influence de l'absorption du signal marginale : la diffusion contribue donc à elle seule à atténuer le signal. Cependant, à l'instar de l'absorption, la diffusion dans les tissus est elle aussi largement dépendante de la longueur d'onde ( $l_d \propto \lambda^{2.4}$  selon source), mais surtout du matériau traversé comme décrit figure 1.12. Pour limiter la perte de signal due à la diffusion, on aura tendance à choisir des longueurs d'ondes plus élevées, aux alentours de 1000 à 1300 nm [26].

**Aberrations** La dernière source de dégradation du signal provient des aberrations optiques, c'est-à-dire la déformation du front d'onde du faisceau, qui provient de la disparité d'indice

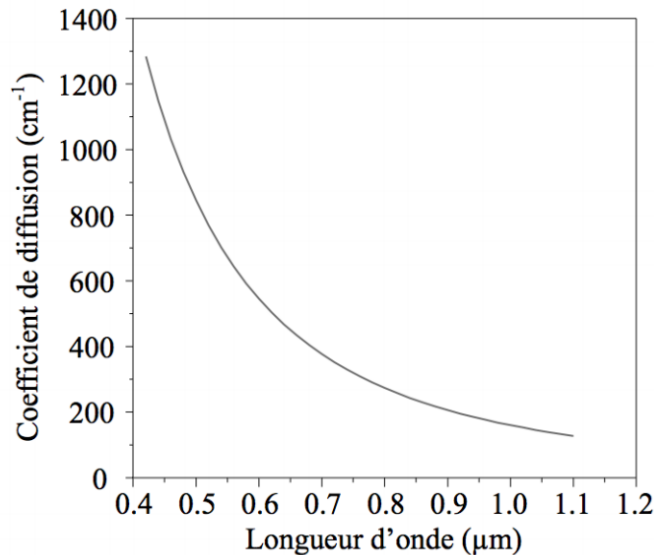


FIGURE 1.12: Courbe de l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la longueur d'onde. Tiré de [20].

de réfraction au sein des tissus. Elles ont pour effet de dégrader notamment la focalisation du faisceau et donc le niveau de signal, le RSB et la qualité globale des images obtenues.

#### 1.2.4 Microscopie de fluorescence excitée à 2 photons pour la biologie

L'absorption à 2 photons fut prédite théoriquement par les travaux de thèse de Maria Göppert-Mayer [27] au début du XXème siècle. Ça n'est que 30 ans plus tard que la validation expérimentale sera conduite par Kaiser et Garrett [28], grâce notamment à l'avènement des premières sources laser. La fluorescence excitée à 2 photons, repose sur l'absorption simultanée de 2 photons par une molécule fluorescente. Celle-ci va alors passer à un état d'énergie excité, puis va se désexciter en réémettant un photon dont l'énergie est la somme des photons absorbés, moins l'énergie correspondant au déplacement de Stokes.

Le **Déplacement de Stokes** correspond à une perte d'énergie par relaxation vibrationnelle. En effet, lorsque la molécule est à un état haut d'énergie, une partie de son énergie va être dissipée sous forme de vibration (phonon), ou de chaleur. Ainsi, en se désexcitant, le photon généré aura une énergie un peu inférieure à 2 fois l'énergie des photons incidents. Cela se traduit par une longueur d'onde légèrement plus grande que 2 fois la longueur d'onde des photons excitateurs. Dans la pratique, on observera un décalage du spectre d'émission par rapport à la moitié du spectre d'excitation. Le processus de fluorescence à 2 photons, bien que similaire à son équivalent à 1 photon à de nombreux égards, s'en distingue par quelques différences importantes. Ce sont tous deux des processus isotropes, pour lesquels l'émission du photon généré peut se faire dans toutes les directions de l'espace. C'est également un processus incohérent, mais qui bien que d'ordre 2, dépend lui de la partie imaginaire de l'ordre 3 de la susceptibilité non-linéaire de l'échantillon  $\chi^{(3)}$ . Ainsi, les spectres d'absorptions à 2 photons sont généralement différents des spectres d'absorption à 1 photon.

**Fluorophores** Il existe deux principales sources possibles de contraste en microscopie à fluorescence : les marqueurs endogènes et les marqueurs exogènes. Les premiers sont des fluorophores déjà présents dans les structures biologiques, utilisés notamment en médecine, comme par exemple en dermatologie. Les seconds sont des marqueurs insérés au sein de l'organisme par voie physique ou plus généralement génétique. Ils permettent alors de repérer

des structures spécifiques de l'organisme comme des molécules, protéines, cellules, par l'ajout de protéines fluorescentes associées à celles-ci. Ces marqueurs sont largement utilisés en biologie du développement notamment, de par leur grande spécificité et la très large gamme de protéines fluorescentes disponibles (figure 1.13).

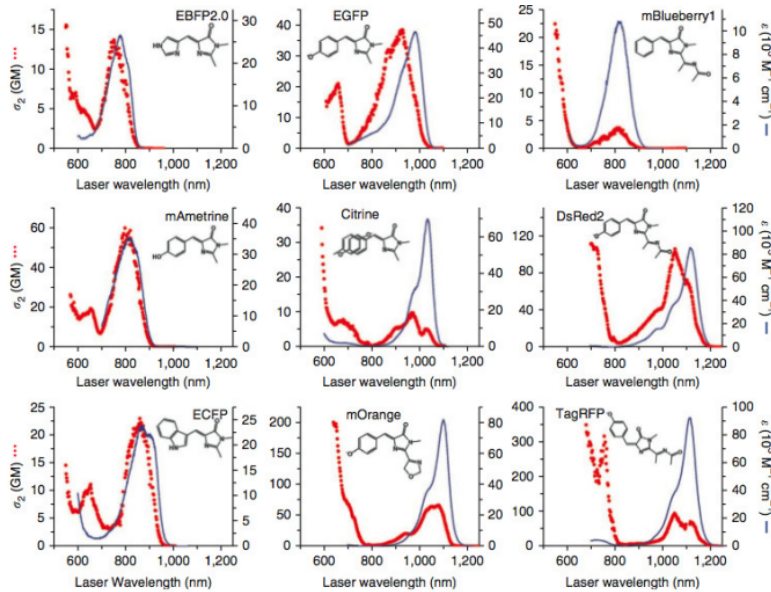


FIGURE 1.13: Exemples de spectres de quelques protéines fluorescentes typiques en 2-photon. Tiré de [29].

### 1.2.5 La microscopie SHG et THG pour la biologie

La génération de seconde et de troisième harmonique, aussi dénotées SHG et THG, font toutes deux partie de la famille des techniques de microscopie multiphoton dites cohérentes [18; 30] : cela signifie que les photons produits par le milieu conservent l'information de phase. Ceci leur permet d'interférer de manière constructive ou destructive, selon des conditions spécifiques sur les vecteurs d'onde, appelées accords de phase. Ces contraintes conditionnent alors la source et la nature des signaux obtenus par ces modalités, et en font des outils indispensables à l'étude d'organismes vivants.

**SHG** La création de ce type de signal repose sur les propriétés non-linéaires propres au milieu observé. Un faisceau de fréquence  $\omega$ , focalisé sur le milieu générera, sous les bonnes conditions, un faisceau de fréquence double  $2\omega$  (et donc d'énergie double). Le signal SHG étant un effet non-linéaire d'ordre pair, la génération de signal ne peut se produire que dans les matériaux non-centrosymétriques, sous peine d'induire des interférences destructives entre les ondes résultantes (figure 1.14). La contribution du signal produit est, à l'instar de la microscopie de fluorescence à 2 photons, de dépendance quadratique avec le faisceau exciteur.

**THG** La génération de troisième harmonique est l'extension à trois photons de la SHG. C'est également un processus cohérent, impliquant l'interaction de trois photons de fréquence  $\omega$  alors convertis (sous certaines conditions) en un photon de fréquence triple  $3\omega$ . Pour ce mode de contraste, il n'y a pas de configuration d'annulation de la susceptibilité non-linéaire  $\chi^{(3)}$  : toutes les structures sont susceptibles de produire ce type de signal. Cependant, les milieux homogènes induisent des interférences destructives et ne produiront pas de signal

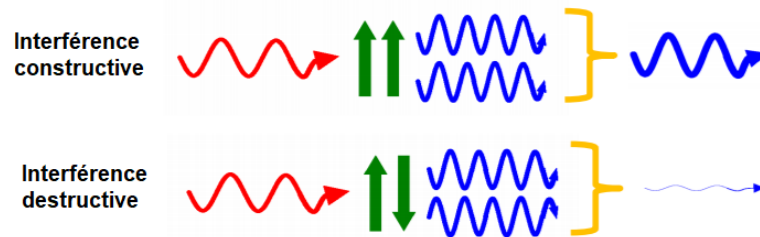


FIGURE 1.14: Interférences constructives et destructives du signal SHG dans les milieux. Tiré de [15].

THG : il faut alors que le faisceau excitateur soit focalisé aux abords d'une interface ou plus généralement d'une hétérogénéité pour limiter ce phénomène et collecter du signal au niveau du détecteur.

**Directivité** La SHG et la THG étant tous deux des processus cohérents, la distribution angulaire et la puissance du signal produit est largement dépendante de la structure des milieux imagés ainsi que du faisceau excitateur. Pour que le signal puisse interférer constructivement, le signal produit doit respecter certaines conditions sur la phase. Ainsi, le signal SHG peut être très directif en fonction de la structure et l'orientation des dipôles du milieu, comme illustré figure 1.15. On retrouve deux directions privilégiées de radiation : la propagation avant et la propagation arrière.

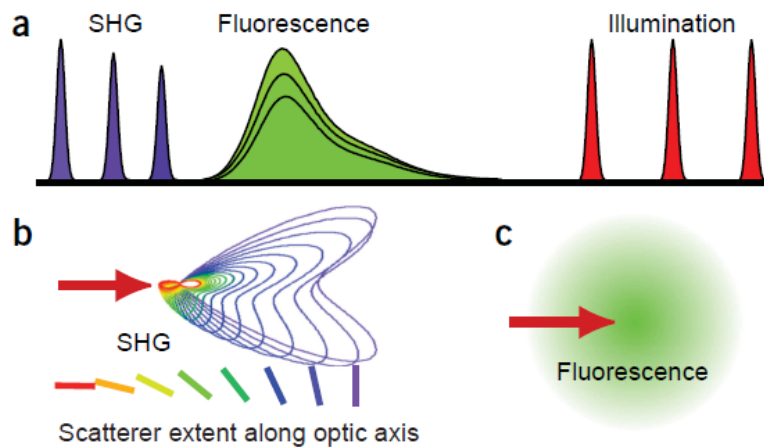


FIGURE 1.15: a. Réponse spectrale du signal 2PEF et SHG pour une illumination donnée. Le signal SHG est exactement à une longueur d'onde deux fois inférieure à la longueur d'onde d'excitation ; b. Directivité du signal SHG pour différentes orientations des dipôles non-linéaires ; c. Émission isotrope du signal de fluorescence. Tiré de [22].

**La SHG et la THG à l'étude de la biologie** Les milieux privilégiés à la génération de signal SHG par interférences constructives sont alors les structures très organisées. Le signal THG est quant à lui spécifique des interfaces et hétérogénéités. Ces propriétés confèrent une spécificité très intéressante à ces modalités, ce qui en font des techniques de choix à l'étude de phénomènes biologiques. Par ailleurs, les processus cohérents sont des modes de contrastes endogènes qui ont l'avantage d'être non-invasifs : le signal provient des propriétés optiques intrinsèques des milieux, ce qui permet d'observer des phénotypes non-altérés, ni génétiquement, ni physiquement.

On en trouve dans les organismes biologiques à plusieurs niveaux. Dans les fibres musculaires d'abord, qui sont des assemblages de filaments de myosine structurés au sein des sarcomères, les unités de base constitutives du muscle [31; 32]. Ainsi, on trouve du signal SHG dans les muscles squelettiques, mais aussi dans le coeur, autrement appelé le myocarde (muscle cardiaque). Nous reviendrons largement sur cette propriété au cours de ce manuscrit, qui nous permettra d'obtenir un contraste spécifique du muscle, sans marquage. Par ailleurs, le collagène, la protéine la plus abondante du corps humain, permet également la génération de signal SHG dans les tendons, la cornée, les artères ou encore la peau [22; 33; 34]. La figure 1.16 illustre les signaux SHG collectés dans quelques-uns des biopolymères typiques. La THG quant à elle, permet de repérer les hétérogénéités, notamment les interfaces lipidiques et aqueuses. Son utilisation permet par exemple un mode contraste sans marquage du contour cellulaire [35].

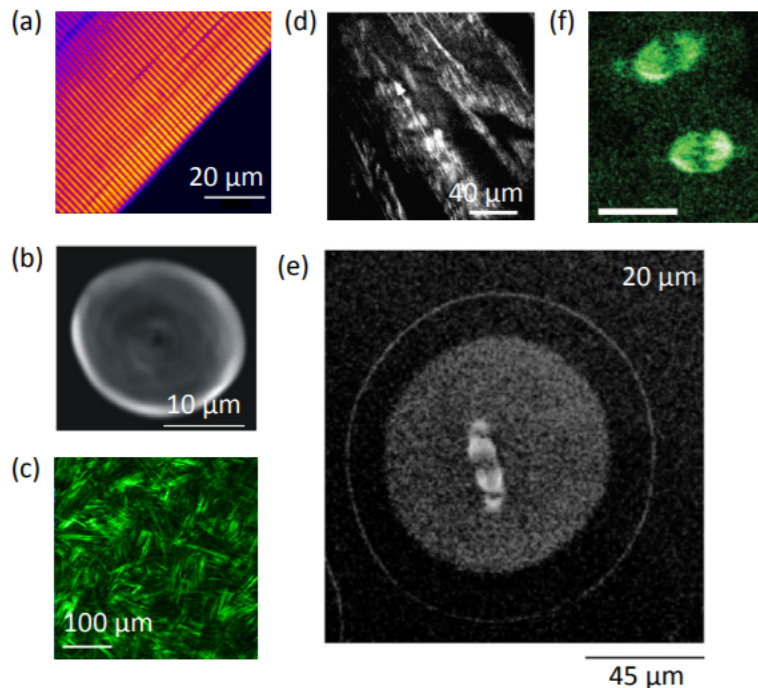


FIGURE 1.16: Source de signal SHG dans les biopolymères du vivant. (a) La myosine (muscles squelettiques). (b) L'amylopectine (amidon de blé). (c) Le collagène (stroma de la cornée). (d) Le cellulose (paroi cellulaire de plante). (e,f) Les microtubules (division cellulaire). Tiré de [15].

### 1.2.6 La microscopie multiphoton pour imager les cils et le coeur

La microscopie multiphoton est un outil de choix à l'observation des deux phénomènes biologiques que sont le battement du coeur et les cils cellulaires motiles. D'abord, ces deux structures sont nichées profondément dans les tissus embryonnaires et imposent ainsi une bonne pénétration des faisceaux, apportée par l'imagerie multiphotonique et sans laquelle leur observation serait impossible. Par ailleurs, la technique permet la génération de signaux d'harmonique qui trouvent un retentissement tout particulier à l'étude du coeur : celui-ci étant un muscle, ses fibres peuvent alors être révélées sans marquage par contraste SHG. Cependant, le principal reproche que l'on peut adresser à la microscopie multiphoton concerne sa vitesse d'imagerie, ne permettant pas l'observation des phénomènes hautement dynamiques en jeu. Ainsi, dans la section suivante, nous détaillerons les problèmes liés à une vitesse d'imagerie trop faible, de même que les enjeux associés à l'amélioration de celle-ci. Nous tenterons d'exprimer nos besoins de résolutions temporelles et spatiales, qui permettront une visualisation pertinente des mouvements biologiques de notre étude.

## 1.3 Imager plus vite

Les mouvements périodiques que l'on souhaite étudier, des cils cellulaires et du cœur de poisson-zèbre, sont tous deux des mouvements rapides. Dans cette section, nous nous attarderons sur cette propriété : nous établirons en quoi la vitesse d'imagerie est un paramètre crucial à la bonne résolution d'un mouvement, à la fois dans le temps et dans l'espace, autant qu'elle est indispensable à la génération d'une image reflétant la réalité biologique. En particulier, notre étude requiert une imagerie rapide, avec une bonne résolution tridimensionnelle, et permettant la génération des signaux d'harmoniques. Nous verrons que cela impose l'utilisation de la géométrie colinéaire en illumination et détection. Nous présenterons alors les techniques multiphotons permettant d'améliorer la vitesse d'imagerie, leurs avantages et leurs limitations, puis les confronterons aux besoins techniques de ce projet.

### 1.3.1 Résolutions spatiale et temporelle : le grand compromis ?

La résolution spatiale peut-être décrite comme la mesure de la distance minimale entre deux objets, permettant de les distinguer à l'image. De manière analogue la résolution temporelle est la finesse avec laquelle on peut distinguer deux événements ponctuels dans le temps. Souvent, elles sont confondues avec les notions d'échantillonnages, qui représentent le découpage numérique, spatial ou temporel, associé aux acquisitions. Dans le cas général, la résolution est conditionnée d'une part par l'échantillonnage, mais aussi par les caractéristiques intrinsèques du système. Spatialement, cette dernière correspond à la réponse impulsionnelle spatiale du système, aussi appelée PSF ; elle dépend de la configuration optique du microscope et est souvent limitante de la résolution. À l'inverse, la résolution temporelle est en règle générale limitée par son échantillonnage, la réponse temporelle des détecteurs modernes étant très rapide. Comme il l'a été décrit par la figure 1.9, il est cependant très difficile d'obtenir à la fois une bonne résolution temporelle, une bonne résolution spatiale tout en conservant un RSB acceptable sur un échantillon sain. L'imagerie biologique est une affaire de compromis.

Ainsi, il semble que les résolutions temporelles et spatiales soient en compétition lors d'une acquisition : à puissance laser et RSB de l'image constants, augmenter l'échantillonnage spatial signifie dégrader l'échantillonnage temporel, et inversement. En effet, augmenter l'échantillonnage spatial signifie d'avantage de pixels à balayer, et donc qu'il faudra plus de temps pour passer séquentiellement sur chaque pixel de l'image : le temps entre deux images consécutives sera plus long, ce qui équivaut à un échantillonnage temporel moins important. Dans le cas général, cela se traduit par une dégradation de la résolution temporelle. De manière analogue, acquérir une image avec un meilleur échantillonnage temporel se répercute nécessairement sur les autres paramètres, notamment l'échantillonnage et par extension la résolution spatiale (à RSB, champ de vue et puissance constants).

Dans la section suivante, nous allons établir que ces deux propriétés de l'acquisition sont, dans le cas dynamique, liées l'une à l'autre. Nous verrons ainsi qu'améliorer la résolution temporelle permet également d'améliorer la résolution spatiale pour les phénomènes rapides.

### 1.3.2 Imagerie dynamique : quelle résolution temporelle ?

Au laboratoire, la taille typique de la résolution spatiale associée au microscope que nous utilisons est de l'ordre d'une fraction de micromètre. Dans le cadre de nos études, cette résolution est indispensable à la résolution des mouvements les plus fins du cœur et des cils. Malgré la mise en opposition courante des résolutions spatiales et temporelles, ces deux notions sont dans le cas dynamique, intrinsèquement liées : lors de l'imagerie d'un objet en mouvement, une mauvaise résolution temporelle aura pour effet de dégrader la résolution spatiale. Ainsi, nous proposons ici de définir ce que l'on appelle une *mauvaise résolution temporelle*, en fonc-



tion de la dynamique de l'objet que l'on souhaite imager. La question à laquelle nous allons tenter de répondre ici est alors : *quelle est la résolution temporelle nécessaire d'imagerie permettant de conserver une résolution spatiale inférieure à 1  $\mu\text{m}$  ?*

Cil cellulaire		Cœur
$\sim 5 \times 5 \times 5 \mu\text{m}$	Taille	$\sim 200 \times 200 \times 200 \mu\text{m}$
20-40 Hz	Fréquence	2-4 Hz
Jusqu'à 300 $\mu\text{m/s}$	Vitesse	Jusqu'à 1000 $\mu\text{m/s}$

FIGURE 1.17: Les différentes échelles des deux structures biologiques étudiées dans ce manuscrit.

Dans cette section, notre objectif est de déterminer la résolution temporelle à atteindre pour l'imagerie de nos deux phénomènes biologiques périodiques : le cil cellulaire motile et le cœur battant. D'eux, nous souhaitons obtenir une image tridimensionnelle en microscopie multiphoton, présentant une résolution de l'ordre du micromètre spatialement, et dont la résolution temporelle nous permette d'en résoudre le mouvement au cours du temps. Pour rappel, le tableau figure 1.17 liste les différentes échelles associées à ces deux systèmes. Nous y relevons tout particulièrement les vitesses très élevées, comparativement à la résolution micrométrique que nous souhaitons atteindre : de l'ordre du millimètre par seconde. L'enjeu est alors de conserver une bonne résolution spatiale malgré les vitesses rapides des objets imagés. Dans la suite, nous présentons les dégradations associées à l'imagerie dynamique, en particulier lorsque la vitesse d'acquisition n'est pas suffisante au regard du mouvement des structures imagées. Nous développerons deux cas associés à des modes d'imagerie différents d'une image : le flou cinétique associé à une acquisition en plein champ, et les artefacts de balayage que l'on retrouve lors d'une acquisition séquentielle point par point.

### 1.3.2.1 Flou cinétique

Dans cette partie, on se place dans le cas d'une acquisition plein champ d'une image, c'est-à-dire telle que tous les pixels sont collectés simultanément pendant un temps d'intégration  $\Delta t$ . C'est notamment le cas en illumination à nappe de lumière, dont le fonctionnement sera détaillé dans la section suivante. Dans ces conditions, la fréquence d'imagerie correspondante est alors  $f = 1/\Delta t$ .

Lors de l'acquisition d'une image d'un objet en mouvement, la PSF statique d'un système optique et son échantillonnage associé caractérisent la résolution spatiale. Par le mouvement de l'objet, la PSF équivalente va être étalée spatialement, de par la détection non-ponctuelle dans le temps. Elle provoque ainsi un *flou cinétique*, comme présenté au (a) de la figure 1.18. En effet, chaque détecteur se doit de collecter le signal utile pendant un temps  $\Delta t = 1/f$  : le signal de l'objet suivant la trajectoire qu'il aura emprunté durant ce laps de temps sera ainsi collecté et résultera en un flou à l'image ; la résolution spatiale est alors dégradée, puisqu'il est plus difficile de distinguer deux points proches sur l'image. Cette dégradation est d'autant plus importante que le temps d'intégration  $\Delta t$  est grand. La figure 1.18 (b) illustre cet effet commun en photographie.

Afin de quantifier le problème du flou cinétique, nous avons calculé la résolution maximale atteignable pour le cœur et le cil en fonction de la fréquence d'acquisition  $f = 1/\Delta t$  : la courbe apparaît figure 1.19. Grâce à ces courbes, on comprend l'utilité d'augmenter la vitesse d'imagerie : pour le cœur, si l'on souhaite atteindre la résolution spatiale propre au microscope de 1  $\mu\text{m}$ , il est alors nécessaire de collecter 1000 images par seconde. Dans le cas

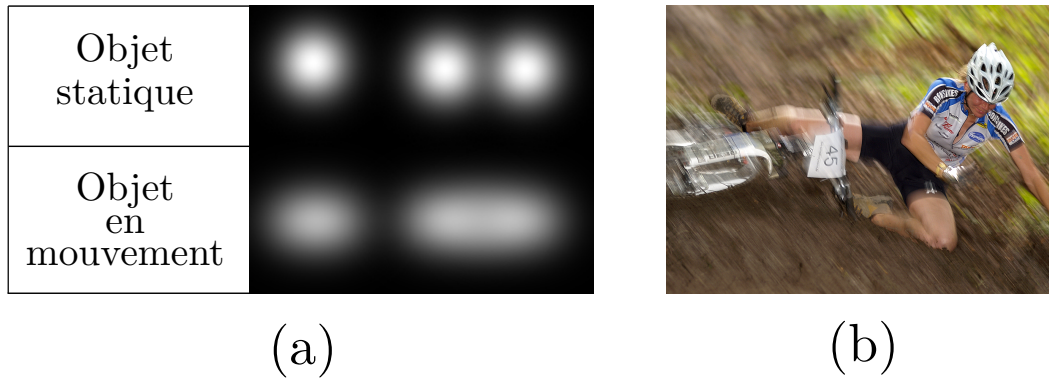


FIGURE 1.18: Influence de la dynamique sur la résolution spatiale. (a) Sur une image, une mauvaise résolution temporelle dégrade la résolution spatiale. (b) Flou cinétique lors d'une photographie d'un sujet dynamique.

tridimensionnel, cela signifie qu'il faut acquérir 1000 volumes par seconde pour que le flou cinétique ne dégrade pas la résolution spatiale.

### 1.3.2.2 Artefacts de balayages

Dans la pratique, beaucoup de techniques de microscopie ne proposent pas d'acquérir toute une image de manière simultanée. En particulier, la technique standard d'acquisition d'une image en microscopie multiphoton repose sur le balayage séquentiel de chaque pixel : c'est la microscopie à balayage (figure 1.20, ici présentée en 1-photon). Ainsi, dans cette configuration, on n'observe pas directement le flou cinétique exposé précédemment : la dégradation de résolution temporelle prend alors une autre forme, celle des *artefacts de balayage*.

Le problème est alors légèrement différent : lors d'une acquisition d'un volume point par point, on balaye les pixels dans la direction X (une ligne), puis Y (un plan), puis Z (le volume). Ainsi, pour une fréquence d'acquisition donnée, le premier et le dernier pixel auront été balayés avec un écart temporel de  $\Delta t = 1/f$ . Lorsque la vitesse d'acquisition est trop faible au vu du mouvement de l'objet imagé, celui-ci va se déplacer au cours du balayage des pixels. Il en résulte le type d'image observée à la figure 1.21. L'image (a) témoigne du problème principal associé à un balayage trop lent des pixels : ce que l'on observe à l'image n'est pas ce qui se produit dans la réalité, mais en est une version artefactuelle, temporellement déformée du mouvement. En (b), un exemple d'artefact de balayage à l'imagerie d'un cil cellulaire motile au sein de la vésicule de Kupffer, que nous exploiterons au chapitre 2. Ainsi, pour ne pas limiter la résolution spatiale dans cette configuration, on peut alors avancer qu'il ne faut pas que l'objet ait trop bougé entre le début et la fin de l'acquisition d'un volume. Pour conserver la pertinence biologique de nos images, on définit alors le même critère que précédemment : que l'objet ne se soit pas déplacé de plus de  $1 \mu\text{m}$  entre deux images. Cela correspond alors aux courbes de la figure 1.19, les conclusions sont alors les mêmes.

Pour conclure, nous avons établi dans cette partie la nécessité d'imager jusqu'à 1000 volumes par seconde dans le cas du cœur, afin de conserver la résolution spatiale intrinsèque du microscope. Dans la suite, nous détaillerons les différentes techniques d'imagerie rapide qui pourraient répondre à ce cahier des charges.

### 1.3.3 État de l'art de la vitesse d'imagerie

De la microscopie point par point à 2 photons (*2-photon Laser Scanning Microscopy*, 2p-LSM) de nombreuses techniques ont été développées afin de permettre des vitesses d'imagerie

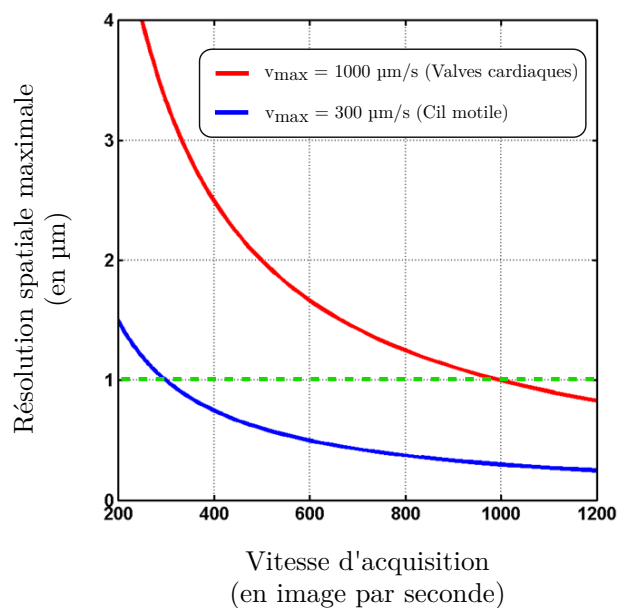


FIGURE 1.19: Résolution spatiale maximale limitée par flou cinétique, pour le cœur et le cil motile.

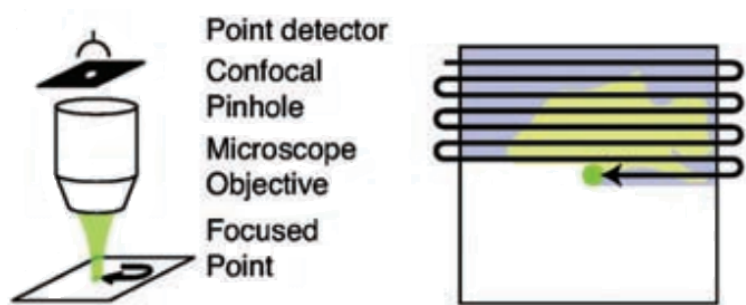


FIGURE 1.20: Microscopie à balayage point par point. Pour reconstituer une image 3D, le faisceau balayage séquentiellement tous les pixels du volume de l'image. La détection ponctuelle du signal se fait au moyen d'un tube photomultiplicateur (PMT). Adapté de [36].

plus élevées en imagerie multiphoton. En particulier, on peut scinder ces développements en deux types d'approches [38] : la première consiste à balayer plus vite les pixels, réduisant ainsi le temps requis de chaque étape du balayage. La seconde consiste à paralléliser l'excitation et la détection, réduisant ainsi le nombre d'étapes de balayage à l'imagerie d'un volume entier. Dans cette section, nous détaillerons les différentes méthodes associées à chaque type, les limitations communes ainsi que les spécificités propres de chaque technique. Par ailleurs, nous tâcherons d'exprimer les différences associées à la génération d'un signal de fluorescence et d'harmoniques dans ces configurations. La fluorescence produit un signal fort, mais requiert un temps d'excitation pouvant limiter la vitesse d'acquisition et est sujet au photoblanchiment. À l'inverse, la dynamique rapide des signaux d'harmonique permet un passage court sur chaque pixel, mais requiert des puissances crêtes élevées pouvant porter atteinte à l'intégrité de l'échantillon biologique imagé.

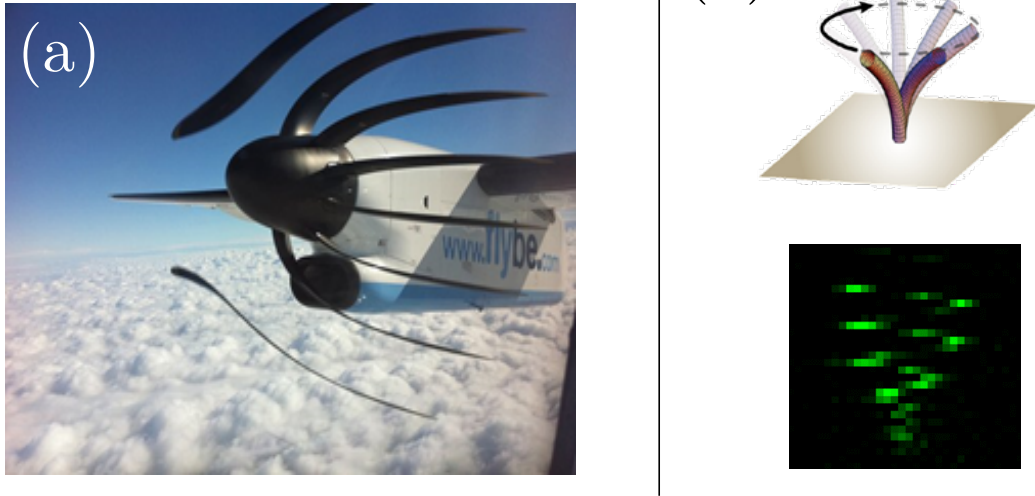


FIGURE 1.21: Illustration de l'artefact de balayage à l'imagerie d'un objet dynamique. (a) Exemple d'artefact en photographie, causé par le phénomène de l'obturateur déroulant (*rolling shutter* en anglais). (b) Artefact de balayage causé par le mouvement du cil motile en microscopie point par point multiphoton, dans la vésicule de Kupffer. Marquage arl13b en GFP spécifique des cils [37].

### 1.3.3.1 Balayage plus rapide

En géométrie point par point, l'échantillonnage temporel correspond au temps nécessaire pour parcourir chaque pixel du volume. En considérant un volume de dimensions  $(n_X, n_Y, n_Z)$  pixel, le temps entre deux images  $\Delta T = \frac{1}{f_{Vol}}$  se calcule en fonction du temps  $t_{dwell}$  passé sur chacun d'entre eux, tel que :

$$\Delta T = n_X \times n_Y \times n_Z \times t_{dwell} = \frac{1}{f_{Vol}} \quad (1.6)$$

Pour accélérer l'acquisition d'une image, on peut alors réduire le temps  $t_{dwell}$  passé sur chaque pixel : en d'autres termes, balayer plus rapidement les pixels du volume. Pour ce faire, de nombreuses modalités d'imagerie ont été imaginées. L'approche la plus évidente est alors d'utiliser des techniques de balayages plus rapides que les miroirs galvanométriques classiques. Parmi celles-ci, on trouve notamment l'utilisation de scanners résonnants [39; 40] ou de scanners polygonaux [41; 42] permettant de parcourir les lignes du volume plusieurs dizaines de milliers de fois par seconde (10 kHz), soit une centaine de fois plus que par miroirs conventionnels. Les scanners résonnants sont des miroirs galvanométriques optimisés pour la vitesse, par propriété de résonance. Le principe du scanner polygonal se base sur la réflexion du faisceau excitateur sur les faces d'un miroir polygonal opérant une rotation sur lui-même. Les deux procédés permettent d'atteindre des vitesses très élevées, mais pas le contrôle précis de la position du faisceau : leur unique mode de fonctionnement est alors le balayage rapide. Leur utilisation ne permet alors pas de modifier le champ de vue de balayage et souffre d'un manque de flexibilité.

Une autre méthode, différente des scanners mécaniques présentés précédemment propose des vitesses analogues : c'est le balayage rapide des lignes par scanners acousto-optiques [43]. Le principe est de faire passer le faisceau excitateur dans une cellule dite de Bragg, dont l'indice optique peut être modulé par une variation de pression interne du milieu (onde acoustique), induite par une cellule piézo-électrique. En modifiant l'indice, on modifie également les propriétés de réfraction du milieu et donc les angles d'émission du faisceau qui le traverse. Là

encore, la technique permet d'atteindre une fréquence de balayage de lignes de l'ordre de la dizaine de kilohertz, mais autorise, à l'inverse des techniques mécaniques, d'accéder à chaque point de l'image et donc d'acquérir des champs de vue partiels. Par ailleurs, certains développements ont permis d'étendre cette propriété au volume tridimensionnel [44; 45] : le balayage 3D peut alors se faire sans nécessiter de mouvement mécanique de la platine ou de l'objectif. Toutefois, la méthode souffre d'une limitation importante : les cristaux utilisés présentent de la dispersion, résultant en un élargissement temporel des impulsions laser femtosecondes et donc en une dégradation l'excitation multiphoton. Bien que la correction du phénomène soit possible [46; 47], ce problème reste une limitation de la méthode.

**Limitations du balayage rapide** Ces méthodes permettent de parcourir séquentiellement les pixels d'un volume avec une fréquence en ligne de plusieurs dizaines de kilohertz. Ces vitesses sont un ordre de grandeur supérieures aux techniques classiques, et permettent d'améliorer la résolution temporelle théorique d'un facteur 10. Toutefois, et comme le rappelle la figure 1.9, cette technique nécessite de compromettre un autre aspect de l'imagerie : balayer 10 fois plus vite signifie donc passer l'équivalent de 10 fois moins de temps sur chaque pixel, dégradant ainsi le Rapport Signal sur Bruit (RSB). Par ailleurs, la photophysique des fluorophores nécessite toute de même un temps d'exposition minimal de l'ordre de la microseconde pour émettre des photons. Le signal SHG est quant à lui plus faible en règle générale : il faudrait alors augmenter la puissance laser des impulsions utilisées pour compenser ceci, auquel cas les dommages phototoxiques seront largement amplifiés.

**Temps d'intégration équivalent** Dans ce paragraphe, nous proposons d'estimer la vitesse de balayage qu'il nous faudrait atteindre si l'on souhaitait imager à  $f_{Vol} = 1000$  volumes par seconde, par ces méthodes. Pour l'exemple, nous considérerons alors l'acquisition d'un volume typique de  $(n_X, n_Y, n_Z) = 200 \times 200 \times 10$  pixels, avec un balayage en ligne de  $f_{ligne} = \frac{1}{t_{dwell} \times n_X}$ . On peut alors remonter à la fréquence en ligne par le calcul suivant :

$$f_{ligne} = f_{Vol} \times n_Y \times n_Z = 1000 \times 200 \times 10 = 2 \text{ MHz} \quad (1.7)$$

Pour nos acquisitions volumiques, il nous faudrait ainsi une fréquence en ligne de 2 MHz, bien au-delà des 10 kHz proposés par les techniques énoncées précédemment. De plus, cela correspond à un temps d'exposition par pixel de  $t_{dwell} = \frac{1}{n_X \times f_{ligne}} = 2.5 \text{ ns}$ , très inférieur à la microseconde typique de la photodynamique des fluorophores. La méthode ici présentée ne peut alors pas répondre à la contrainte de vitesse de nos acquisitions : il faut s'orienter vers d'autres techniques.

### 1.3.3.2 Paralléliser l'excitation et la détection

L'autre manière d'augmenter la vitesse d'imagerie est d'acquérir plusieurs pixels simultanément, c'est-à-dire de paralléliser l'imagerie. De la même manière, de nombreux développements ont exploré cette piste, permettant des améliorations drastiques de résolutions temporelles des images 3D. Dans la suite, nous détaillerons plusieurs approches majeures : les acquisitions multipoints, les acquisitions plein champ ou encore la microscopie à nappe de lumière.

La première forme de parallélisation consiste en l'illumination simultanée de plusieurs points de l'image. On appelle cette technique la microscopie multipoints (*multifoci microscopy* en anglais, au centre de la figure 1.22) [49; 50]. De la sorte, on divise le temps d'acquisition par le nombre de points que l'on acquiert simultanément. Par exemple, la microscopie à disques rotatifs (*spinning disk microscopy*, SDC) tire avantage de cette méthode [51] : le faisceau exciteur est scindé en un nombre important de points par un disque composé d'un

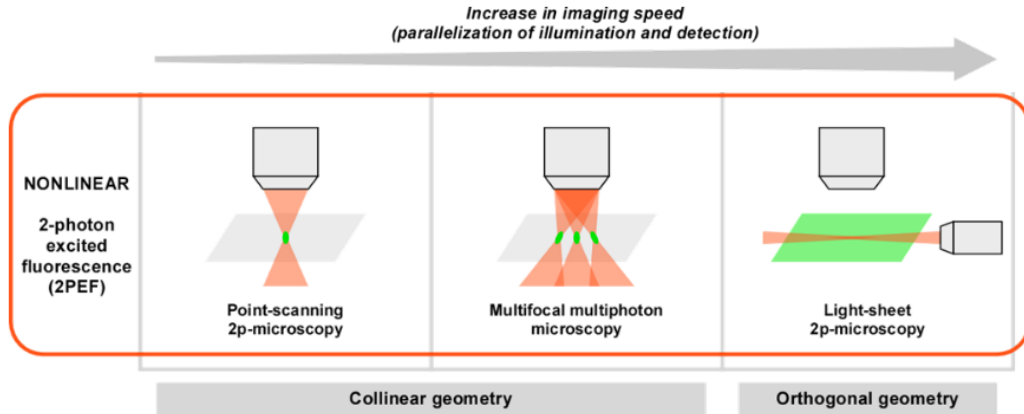


FIGURE 1.22: Techniques classiques de parallélisation de l'excitation et de la détection en microscopie multiphoton. Adapté de [48]

réseau de microlentilles. En tournant, celui-ci permet de balayer l'étendue du plan de l'image par les nombreux foyers ainsi générés. Le degré de parallélisation dépend alors du nombre de faisceaux, mais peut atteindre un facteur  $10^3$ , ce qui nous permettrait de nous rapprocher des vitesses nécessaires à l'imagerie dynamique du cœur et des cils. Cependant et dans la pratique, l'illumination simultanée de 1000 foyers soumet l'échantillon à des puissances moyennes importantes et induisent de forts dommages phototoxiques à celui-ci. De plus, la méthode est moins performante en profondeur du fait de la proximité des foyers sur l'échantillon : la diffusion dans les tissus peut alors faire interférer les illuminations voisines et ainsi dégrader la résolution et le RSB.

D'autres techniques permettent de paralléliser encore d'avantage, en proposant notamment l'acquisition de plans voire de volumes entier, sans balayage : c'est ce que l'on dénote ici sous le terme de méthode en champ large. Parmi elles, la méthode de focalisation temporelle (*temporal focusing*), propose de paralléliser l'acquisition d'un plan en focalisant, dans les temps, les impulsions du faisceau au plan d'imagerie [52–55]. Cette technique permet donc un sectionnement optique sans balayage et en géométrie colinéaire. Toutefois, la méthode est limitée en profondeur puisque la résolution en Z est rapidement dégradée, bien que tend à s'améliorer [53]. Par ailleurs, l'efficacité d'excitation est faible ce qui limite alors la génération de signal, et par extension la résolution temporelle maximale accessible. Elle correspond à des vitesses de l'ordre de 100 plans par seconde sur des champs de vue typiques de  $200 \times 100 \mu\text{m}$  [56].

En géométrie colinéaire toujours, la technique de microscopie à champ de lumière (*light field microscopy*) [57] permet l'acquisition d'une image tridimensionnelle sans balayage. La technique utilise un réseau de microlentilles, permettant de projeter sur le détecteur des images de l'échantillon par celle-ci. Ainsi, on collecte à la fois l'information spatiale et angulaire, permettant une reconstruction a posteriori de l'image volumique. Bien que la méthode présente une mauvaise résolution axiale et soit fortement sensible à la diffusion dans les tissus [58], de tous récents travaux ont permis d'obtenir des volumes à plus de 100 Hz [42; 58–60] pour des champ de vue importants ( $300 \times 300 \times 300 \mu\text{m}$  pour [59]).

La technique la plus populaire en imagerie biologique rapide propose cependant une géométrie d'illumination orthogonale : c'est la microscopie à nappe de lumière [25; 61; 62] (*light-sheet microscopy*, image de droite de la figure 1.22). La méthode repose sur l'éclairage d'un plan orthogonal à l'axe de détection, permettant un sectionnement optique intrinsèque. On

n'illumine qu'un unique plan, au moyen d'une nappe statique ou obtenue par d'un balayage rapide d'un laser [63], méthode privilégiée en excitation 2-photon [25]. Entre autres avantages, elle permet de par sa géométrie d'illumination de limiter les effets phototoxiques tout en présentant de bonnes résolutions axiales et latérales. La technique a largement été utilisée à l'étude de phénomènes rapides, et permet des vitesses de l'ordre de plusieurs centaines d'images par seconde sur de larges champs de vues [64; 65], voire volumes par seconde (200 volumes par seconde pour 150x150 pixels par [66]). Ces vitesses sont là encore loin des 1000 volumes par seconde que nécessite la résolution de nos objets biologiques. Par ailleurs, la géométrie orthogonale ne permet pas la génération de signaux d'harmoniques, ceux-ci étant trop directionnels vers l'avant [25]; des développements de nappe de lumière en géométrie colinéaire existent cependant [67]. Les principales techniques de parallélisation et leur caractéristiques associées sont condensées à la figure 1.24.

**Détecteur ponctuel, caméra** Nous avons jusqu'ici abordé la parallélisation de l'excitation, mais il faut également adapter la détection de ce type de techniques. Les deux grandes catégories qui s'opposent ici sont les détecteurs ponctuels, comme les tubes photomultiplicateurs (PMT) utilisés lors d'un balayage point par point, et les caméras permettant l'acquisition de millions de pixels (CCD, EMCCD, sCMOS pour les principaux). Dans la suite de ce paragraphe, on utilisera plusieurs notions pour quantifier la vitesse d'un détecteur : taux pixels (nombre de pixels qu'il est possible d'acquérir par seconde), fréquence d'imagerie (nombre d'images par seconde), et temps d'intégration (temps passé à collecter des photons par pixel).

Les PMT sont utilisés en balayage point par point et sont des détecteurs très sensibles et à grande surface de collection et présentant peu de bruit intrinsèque. Malgré leur excellente dynamique de lecture (*readout rate*, c'est-à-dire la fréquence de conversion d'un photon en pixel numériquement) de l'ordre du gigahertz, les PMT sont associés à une imagerie lente, séquentielle des pixels. Lorsque l'on parallélise l'excitation, en proposant par exemple l'illumination d'un plan entier comme en microscopie à nappe de lumière, il est impératif de détecter simultanément tous les points de l'image sur un réseau de pixel : on utilise alors une caméra. Les différents types de caméras, respectivement CCD, EMCCD et sCMOS proposent un fonctionnement et donc des avantages différents [68–70]. Dans le cadre d'acquisitions rapides, les dernières générations de caméra sCMOS permettent l'imagerie d'un champ de vue de 2000x2000 pixels à 100 images par seconde, soit un taux pixels de 400 MHz théorique maximum.

**Les caméras disponibles sont trop lentes** Ainsi, dans notre cas d'un volume typique de 200x200x10 pixel, l'acquisition à 1000 volumes par seconde requiert un taux pixels de 400 MHz, correspondant à la limite théorique des caméras les plus rapides. Cependant, cette valeur concerne l'imagerie d'un champ de vue complet donc la vitesse d'imagerie maximale est de l'ordre de 100 images par seconde (site constructeur) : nous en nécessitions  $n_Z \times f_{Vol}$ , soit  $10^4$  images par seconde. Les caméras sCMOS ne suffisent donc pas à notre étude. Cependant, de toutes nouvelles générations de caméras proposent aujourd'hui des vitesses de l'ordre supérieurs à 1000 images par seconde (HiCAM Fluo, Lambert Instrument) sur de grands champ de vues (7500 images par seconde pour 256x256 pixels sur le site du constructeur, soit un maximum théorique de 0.13 ms par pixel et à un taux pixels de 500 MHz). Malgré tout, cela correspond à des vitesses d'imagerie volumiques toujours trop faibles pour l'observation de nos phénomènes biologiques et ne permet pas la collection de signal SHG.

Une récente publication de Martin et al. [71] réhabilite cependant l'utilisation des PMT pour l'imagerie rapide en 1-photon, avantageuses de par leur taux de lecture très rapide. Grâce à une barrette de PMT et en configuration nappe de lumière (balayée rapidement par un scanner acousto-optique), ce développement permet d'atteindre des taux pixels de l'ordre

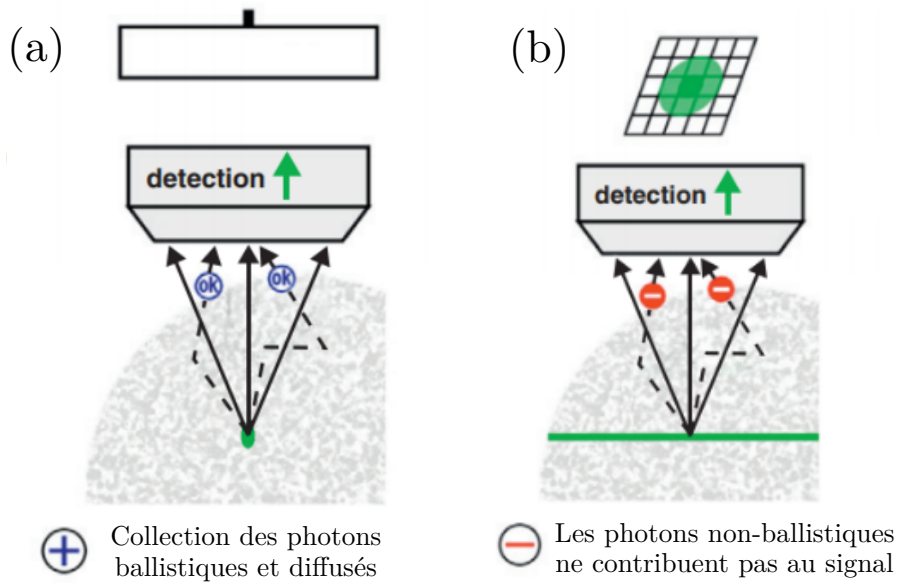


FIGURE 1.23: Efficacité de collection proposée par un détecteur ponctuel en microscopie 2-photon. (a) Dans le cas d'un balayage point par point en géométrie colinéaire, tous les photons ballistiques ou diffusés, qui pénètrent l'objectif proviennent du volume focal et contribuent au signal. (b) En champ large (géométrie orthogonale, illumination multipoints), les photons non-ballistiques ne contribuent pas au signal et peuvent dégrader le contraste : ils ne proviennent pas nécessairement du volume d'intérêt du pixel considéré. Adapté de [48]

du gigahertz sur de très petits champ de vue (68x14 pixels, résolution d'environ 3  $\mu\text{m}$ ). De manière générale, les PMT présentent un avantage de taille sur les caméra en régime en condition faible lumière, illustré en figure 1.23. Lors de la détection par un détecteur ponctuel, tous les photons émis par excitation 2-photon proviennent nécessairement du volume focal : même diffusés, la grande surface de détection permet de collecter ces photons qui peuvent ainsi contribuer au signal. Ceci n'est pas le cas pour les caméras, pour lesquelles les photons non-ballistiques dégradent le contraste de l'image.

Au bilan de cette section, nous avons établi que de nombreux développements et techniques ont permis d'optimiser la vitesse d'imagerie au cours de ces dernières années. Il en demeure que la vitesse nécessaire de 1000 volumes par seconde n'est atteignable par aucune d'entre elle, malgré la parallélisation de l'excitation. Le tableau figure 1.25 expose par ailleurs les derniers développements pour la vitesse de détection et établit que les techniques présentant le taux pixels nécessaire de 400 MHz sont également rares. De manière générale, toutes les techniques permettant d'accélérer les acquisitions proposent de sacrifier un autre paramètre d'imagerie, qu'il soit la résolution, le sectionnement, le RSB, la phototoxicité ou la profondeur d'imagerie. Pour contourner ce problème, nous proposerons dans la suite ce manuscrit des stratégies permettant de résoudre dynamiquement les mouvements des cils motiles et du cœur battant sans compromettre les performances du microscope.



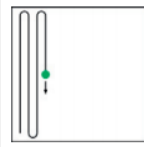
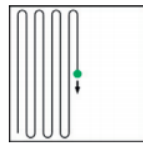
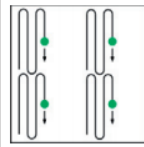
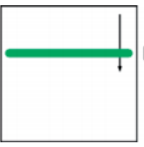
	Microscopie 2 photons point par point	Microscopie 2 photons point par point rapide (N fois)	Microscopie 2 photons multipoints (N foyers)	Microscopie 2 photons à nappe de lumière
Type de balayage	 Point par point	 Point par point rapide	 Multipoints	 Balayage rapide d'une ligne
Vitesse d'acquisition (taux pixel)	$r$	$N r$	$N r$	$N r$
Ouverture numérique objectif	$NA$	$NA$	$NA$	$\frac{1}{\alpha} NA$
Temps d'illumination	$t$	$\frac{1}{N} t$	$t$	$\frac{\alpha^4}{N} t$
Intensité illumination laser	$I$	$\sqrt{N} I$	$I$	$\frac{\sqrt{N}}{\alpha^2} I$
Intensité moyenne illumination	$P$	$\sqrt{N} P$	$N P$	$\sqrt{N} P$

FIGURE 1.24: Récapitulatif des techniques de parallélisation et de leur avantages respectifs. Adapté de [48]

Ref #	Author	Description of imaging method	Pixels per frame	Time per pixel	Switching time	Frame rate [Hz]	Pixel rate [kHz]	Notes
	Our system	Chirped longitudinal AOD with parallel detection	66×14	10 ns	0.59 $\mu$ s / frame	800,000	739,200	Oversampling our resolvable points.
3	Nadella, 2016	3D random access and continuous line scanning with shear AOD	51×50	50 ns	24.5 $\mu$ s / line	739	1,885	
			512×512	50 ns	24.5 $\mu$ s / line	39	10,200	
			1024×1024	50 ns	24.5 $\mu$ s / line	12.9	13,500	
4	Fernandez-Alfonso, 2014	Shear AOD/AOL for random access imaging	512×512	4 $\mu$ s	24 $\mu$ s / point	0.14	36	
			200×200	4 $\mu$ s	24 $\mu$ s / point	0.89	36	
5	Chen, 2011	Chirped shear AOD	250×80	50 ns		1,000	20,000	
			500×500	50 ns		80	20,000	
6	Grewe, 2010	Random access shear AOD	256×256	2 $\mu$ s	10 $\mu$ s / point	1.27	83	
7	Roorda, 2004	Longitudinal chirped AOD	512×480	100ns	2.77 $\mu$ s / line (estimated)	30	7,400	Oversampling resolvable points
1	Bouchard, 2015	Camera-based light sheet microscopy with polygonal scanner (SCAPE)	1400×80			1,000	40,000	
			400×40			2,404	38,464	
			800×80			2,404	153,856	
8	Cheng, 2011	16 kHz resonant mirror, 4 beam multiplexing	512×512			250	65,536	
9	Duocastella, 2017	Camera-based light sheet microscopy with TAG lens	512×512			330	86,508	
10	Chen, 2014	Camera-based light sheet microscopy with Bessel beam	512×512			333	87,294	
2	Mikami, 2018	Frequency multiplexing with an AOD	190×231			16,000	702,240	
	Andor Neo 5.5 sCMOS	Commercial sCMOS (~200 kHz line rate)	2048×8-2560×2160			27,057-100	552,960	

FIGURE 1.25: Récapitulatif de méthodes d'amélioration de vitesse d'imagerie et de leur taux pixels associé. Tiré de [71]

## 1.4 Stratégies d'imagerie pour l'étude de phénomènes périodiques

En vue de comprendre les enjeux biologiques associés au battement périodiques du cil motile et du cœur battant, leur imagerie *in vivo*, tridimensionnelle et dans le temps, est nécessaire pour en visualiser le mouvement. La tâche est cependant ardue, de par l'aspect multi-échelle de ceux-ci : le cœur notamment, mesure plusieurs centaines de micromètres, mais la compréhension de sa contraction nécessite la résolution de structures subcellulaires, de l'ordre du micromètre. Par ailleurs, les vitesses associées à ces deux objets sont très rapides, et requièrent des techniques de microscopie très résolues dans le temps, de l'ordre de la milliseconde, pour s'assurer de capturer une image fidèle à la réalité biologique.

Ainsi, les objectifs de ces travaux sont nombreux : il nous faut imager des volumes de plusieurs centaines de micromètres avec une résolution subcellulaire, à des fréquences proches du kilohertz. Pour réaliser ceci, nous avons vu à la section précédente que les techniques classiques de parallélisation de l'excitation et de la détection n'étaient pas assez rapides, et présentent chacune des limitations incompatibles avec les acquisitions que nous souhaitons conduire. La microscopie multiphoton à balayage est intrinsèquement lente, mais propose de nombreux avantages extrêmement intéressants à nos problèmes. La profondeur d'imagerie ou encore l'efficacité de collection des signaux diffusés qu'elle propose est à ce jour inégalée, mais la technique permet surtout la génération de signaux d'harmoniques, en particulier de SHG. Ce contraste sera utilisé dans la suite comme méthode privilégiée d'étude sans marquage du muscle cardiaque.

Dans ce manuscrit, nous nous proposons d'utiliser **la propriété de périodicité**, commune aux deux modèles biologiques étudiés ici, pour contourner les limitations de vitesses de l'imagerie. Grâce cette propriété, nous proposons de développer des stratégies d'acquisitions originales permettant l'extraction de paramètres biophysiques utiles, de même que l'imagerie rapide de phénomènes cycliques.

Dans le Chapitre 2, nous contournerons les limitations de vitesses en utilisant les artefacts de balayages détaillés dans ce chapitre, afin de comprendre l'établissement de la polarité gauche-droite chez les vertébrés. À partir de ces artefacts, nous développerons une chaîne de traitement capable d'extraire les paramètres biophysiques associés aux cils cellulaires au sein de l'organisateur gauche-droite du poisson-zèbre : la vésicule de Kupffer.

Dans le Chapitre 3, la propriété de périodicité sera exploitée en vue de permettre l'imagerie rapide du muscle cardiaque, par synchronisation a posteriori de lignes balayées rapidement, appelée imagerie XTYZ. Nous présenterons comment nous sommes parvenus à produire des images du cœur battant à plus de 1000 volumes par seconde, en contraste SHG. L'objectif est alors ici de s'émanciper du schéma classique de la pyramide de la frustration (figure 1.9) qui établit que l'on ne peut améliorer la résolution temporelle d'imagerie qu'au détriment d'autres paramètres d'imagerie. Grâce au caractère répétable des mouvements périodiques, nous permettrons d'alléger les contraintes sur l'imagerie en proposant d'ajouter un nouveau sommet à cette pyramide : le temps d'acquisition total.

## 1.5 Références

- [1] W O Friesen and G D Block. What is a biological oscillator? *The American journal of physiology*, 246(6 Pt 2) :R847–53, jun 1984. 4

- [2] M J Berridge and P E Rapp. A comparative survey of the function, mechanism and control of cellular oscillators. *The Journal of experimental biology*, 81 :217–79, aug 1979.
- [3] W O Friesen and G S Stent. Neural Circuits for Generating Rhythmic Movements. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 7(1) :37–61, jun 1978.
- [4] Joseph Higgins. The Theory of Oscillating Reactions - Kinetics Symposium. *Industrial & Engineering Chemistry*, 59(5) :18–62, may 1967. 4
- [5] Theodosios. Pavlidis. *Biological Oscillators : Their Mathematical Analysis*. Elsevier Science, 1973. 4
- [6] Yangxiaolu Cao, Allison Lopatkin, and Lingchong You. Elements of biological oscillations in time and space. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(12) :1030–1034, dec 2016.
- [7] Guillermo Rodrigo, Boris Kirov, Shensi Shen, and Alfonso Jaramillo. Theoretical and experimental analysis of the forced LacI-AraC oscillator with a minimal gene regulatory model. *Chaos : An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 23(2) :025109, jun 2013. 4
- [8] Dean V Buonomano. The biology of time across different scales. *Nature Chemical Biology*, 3(10) :594–597, oct 2007. 5
- [9] Michel Laurent, Nicolas Kellershohn, and Jean-François Hervagault. Multistabilité, oscillations et chaos dans les systèmes biologiques. Technical report. 5
- [10] Jeroen Bakkers. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovascular research*, 91(2) :279–88, jul 2011. 6
- [11] Willy Supatto and Julien Vermot. From Cilia Hydrodynamics to Zebrafish Embryonic Development. *Current Topics in Developmental Biology*, 95 :33–66, jan 2011. 6
- [12] F O Lehmann and M H Dickinson. The changes in power requirements and muscle efficiency during elevated force production in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 200(7), 1997. 6
- [13] Cornelia Schönbauer, Jutta Distler, Nina Jährling, Martin Radolf, Hans-Ulrich Dodt, Manfred Frasch, and Frank Schnorrer. Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects. 2011. 6
- [14] Kenji Kikuchi, Mark A Stremler, Souvick Chatterjee, Wah-Keat Lee, Osamu Mochizuki, and John J Socha. Burst mode pumping : A new mechanism of drinking in mosquitoes OPEN. *ScIENTIfic REPORTS* |, 8 :4885, 2018. 6
- [15] Claire Teulon. *Imagerie quantitative de biopolymères par génération de second harmonique résolue en polarisation*. PhD thesis, oct 2016. 8, 17, 18
- [16] Malte Renz. Fluorescence microscopy-A historical and technical perspective. *Cytometry Part A*, 83(9) :767–779, sep 2013. 9
- [17] W Denk, J H Strickler, and W W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4951) :73–6, apr 1990. 8
- [18] Isaac Freund and Moshe Deutsch. Second-harmonic microscopy of biological tissue. *Optics Letters*, 11(2) :94, feb 1986. 8, 16
- [19] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. *Applied Physics Letters*, 70(8) :922–924, feb 1997. 8

- [20] Pierre Mahou. Microscopie non linéaire de tissus biologiques : excitation multicolore, faisceaux de Bessel, et excitation en nappe de lumière. dec 2012. [9](#), [14](#), [15](#)
- [21] Delphine Debarre. Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie. <http://www.theses.fr>, jan 2006. [10](#)
- [22] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1369–1377, nov 2003. [11](#), [17](#), [18](#)
- [23] J. Mertz. Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy. *The European Physical Journal D - Atomic, Molecular and Optical Physics*, 3(1) :53–66, aug 1998. [11](#)
- [24] P Philippe Laissue, Rana A Alghamdi, Pavel Tomancak, Emmanuel G Reynaud, and Hari Shroff. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nature Methods*, 14(7) :657–661, jun 2017. [12](#)
- [25] Thai V Truong, Willy Supatto, David S Koos, John M Choi, and Scott E Fraser. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 8(9) :757–760, sep 2011. [13](#), [25](#), [26](#)
- [26] Nicolas Olivier. Mécanismes de contraste et contrôle du front d'onde en microscopie non linéaire cohérente. nov 2009. [14](#)
- [27] Maria Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3) :273–294, jan 1931. [15](#)
- [28] W. Kaiser and C. G. B. Garrett. Two-Photon Excitation in Ca F 2 : Eu 2 +. *Physical Review Letters*, 7(6) :229–231, sep 1961. [15](#)
- [29] Mikhail Drobizhev, Nikolay S Makarov, Shane E Tillo, Thomas E Hughes, and Aleksander Rebane. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8(5) :393–399, may 2011. [16](#)
- [30] Shmuel Roth and Isaac Freund. Second harmonic generation in collagen. *The Journal of Chemical Physics*, 70(4) :1637–1643, feb 1979. [16](#)
- [31] William Mohler, Andrew C. Millard, and Paul J. Campagnola. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, 29(1) :97–109, jan 2003. [18](#)
- [32] Sergey V Plotnikov, Andrew C Millard, Paul J Campagnola, and William A Mohler. Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres. *Biophysical journal*, 90(2) :693–703, jan 2006. [18](#)
- [33] Patrick Stoller, Peter M. Celliers, Karen M. Reiser, and Alexander M. Rubenchik. Quantitative second-harmonic generation microscopy in collagen. *Applied Optics*, 42(25) :5209, sep 2003. [18](#)
- [34] Ivan Gusachenko, Gaël Latour, and Marie-Claire Schanne-Klein. Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues. *Optics Express*, 18(18) :19339, aug 2010. [18](#)
- [35] Nicolas Olivier, Miguel A Luengo-Oroz, Louise Duloquin, Emmanuel Faure, Thierry Savy, Israël Veilleux, Xavier Solinas, Delphine Débarre, Paul Bourguine, Andrés Santos, Nadine Peyriéras, and Emmanuel Beaurepaire. Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5994) :967–71, aug 2010. [18](#)

- [36] Julien Vermot, Scott E. Fraser, and Michael Liebling. Fast fluorescence microscopy for imaging the dynamics of embryonic development. *HFSP Journal*, 2(3) :143–155, jun 2008. [22](#)
- [37] Antonia Borovina, Simone Superina, Daniel Voskas, and Brian Ciruna. Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nature Cell Biology*, 12(4) :407–412, apr 2010. [23](#)
- [38] Peter T C So, Elijah Y S Yew, and Christopher Rowlands. High-throughput nonlinear optical microscopy. *Biophysical journal*, 105(12) :2641–54, dec 2013. [22](#)
- [39] Roger Y. Tsien and Brian J. Bacsikai. Video-Rate Confocal Microscopy. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 459–478. Springer US, Boston, MA, 1995. [23](#)
- [40] G Y Fan, H Fujisaki, A Miyawaki, R K Tsay, R Y Tsien, and M H Ellisman. Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with cameleons. *Biophysical journal*, 76(5) :2412–20, may 1999. [23](#)
- [41] Ki Hean Kim, Christof Buehler, and Peter T. C. So. High-speed, two-photon scanning microscope. *Applied Optics*, 38(28) :6004, oct 1999. [23](#)
- [42] Matthew B. Bouchard, Venkatakaushik Voleti, César S. Mendes, Clay Lacefield, Wesley B. Grueber, Richard S. Mann, Randy M. Bruno, and Elizabeth M. C. Hillman. Swept confocally-aligned planar excitation (SCAPE) microscopy for high-speed volumetric imaging of behaving organisms. *Nature Photonics*, 9(2) :113–119, feb 2015. [23](#), [25](#)
- [43] Vijay Iyer, Tycho M. Hoogland, and Peter Saggau. Fast Functional Imaging of Single Neurons Using Random-Access Multiphoton (RAMP) Microscopy. *Journal of Neurophysiology*, 95(1) :535–545, jan 2006. [23](#)
- [44] Gaddum Duemani Reddy, Keith Kelleher, Rudy Fink, and Peter Saggau. Three-dimensional random access multiphoton microscopy for functional imaging of neuronal activity. *Nature Neuroscience*, 11(6) :713–720, jun 2008. [24](#)
- [45] K M Naga Srinivas Nadella, Hana Roš, Chiara Baragli, Victoria A Griffiths, George Konstantinou, Theo Koimtzis, Geoffrey J Evans, Paul A Kirkby, and R Angus Silver. Random-access scanning microscopy for 3D imaging in awake behaving animals. *Nature methods*, 13(12) :1001–1004, dec 2016. [24](#)
- [46] Peng Xi, Yair Andegeko, Dmitry Pestov, Vadim V. Lovozoy, and Marcos Dantus. Two-photon imaging using adaptive phase compensated ultrashort laser pulses. *Journal of Biomedical Optics*, 14(1) :014002, 2009. [24](#)
- [47] Vijay Iyer, Bradley E. Losavio, and Peter Saggau. Compensation of spatial and temporal dispersion for acousto-optic multiphoton laser-scanning microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3) :460, 2003. [24](#)
- [48] Willy Supatto, Thai V Truong, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Advances in multiphoton microscopy for imaging embryos. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(5) :538–548, oct 2011. [25](#), [27](#), [28](#)
- [49] Jörg Bewersdorf, Rainer Pick, and Stefan W. Hell. Multifocal multiphoton microscopy. *Optics Letters*, 23(9) :655, may 1998. [24](#)
- [50] A.H. Buist, M. Müller, J. Squier, and G.J. Brakenhoff. Real-time two-photon absorption microscopy using multi point excitation. *Journal of Microscopy*, 192, 1998. [24](#)

- [51] Takeo Tanaami, Shinya Otsuki, Nobuhiro Tomosada, Yasuhito Kosugi, Mizuho Shimizu, and Hideyuki Ishida. High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks. *Applied Optics*, 41(22) :4704, aug 2002. [24](#)
- [52] Eirini Papagiakoumou, Vincent de Sars, Valentina Emiliani, and Dan Oron. Temporal focusing with spatially modulated excitation. *Optics Express*, 17(7) :5391, mar 2009. [25](#)
- [53] Alipasha Vaziri and Charles V. Shank. Ultrafast widefield optical sectioning microscopy by multifocal temporal focusing. *Optics Express*, 18(19) :19645, sep 2010. [25](#)
- [54] Dan Oron and Yaron Silberberg. Temporal focusing microscopy. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(2) :145–51, feb 2015.
- [55] Eirini Papagiakoumou, Vincent de Sars, Dan Oron, and Valentina Emiliani. Patterned two-photon illumination by spatiotemporal shaping of ultrashort pulses. *Optics Express*, 16(26) :22039, dec 2008. [25](#)
- [56] Li-Chung Cheng, Chia-Yuan Chang, Chun-Yu Lin, Keng-Chi Cho, Wei-Chung Yen, Nan-Shan Chang, Chris Xu, Chen Yuan Dong, and Shean-Jen Chen. Spatiotemporal focusing-based widefield multiphoton microscopy for fast optical sectioning. *Optics Express*, 20(8) :8939, apr 2012. [25](#)
- [57] Marc Levoy, Ren Ng, Andrew Adams, Matthew Footer, Mark Horowitz, Marc Levoy, Ren Ng, Andrew Adams, Matthew Footer, and Mark Horowitz. Light field microscopy. In *ACM SIGGRAPH 2006 Papers on - SIGGRAPH '06*, volume 25, page 924, New York, New York, USA, 2006. ACM Press. [25](#)
- [58] Thai V. Truong, Daniel B. Holland, Sara Madaan, Andrey Andreev, Joshua V. Troll, Daniel E. S. Koo, Kevin Keomanee-Dizon, Margaret McFall-Ngai, and Scott E. Fraser. Selective volume illumination microscopy offers synchronous volumetric imaging with high contrast. *bioRxiv*, page 403303, aug 2018. [25](#)
- [59] Nils Wagner, Nils Norlin, Jakob Gierten, Gustavo de Medeiros, Bálint Balázs, Joachim Wittbrodt, Lars Hufnagel, and Robert Prevedel. Instantaneous isotropic volumetric imaging of fast biological processes. *bioRxiv*, page 459370, nov 2018. [25](#)
- [60] Elizabeth Hillman. High Speed 3D In-Vivo Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 116(3) :7a, feb 2019. [25](#)
- [61] J. Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, aug 2004. [25](#)
- [62] J M Girkin and M T Carvalho. The light-sheet microscopy revolution. *Journal of Optics*, 20(5) :053002, may 2018. [25](#)
- [63] P. J. Keller, A. D. Schmidt, J. Wittbrodt, and E. H.K. Stelzer. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science*, 322(5904) :1065–1069, nov 2008. [26](#)
- [64] Michaela Mickoleit, Benjamin Schmid, Michael Weber, Florian O Fahrbach, Sonja Hombach, Sven Reischauer, and Jan Huisken. High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart. *Nature Methods*, 11(9) :919–922, sep 2014. [26](#)
- [65] Pierre Mahou, Julien Vermot, Emmanuel Beaupaire, and Willy Supatto. Multicolor two-photon light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 11(6) :600–601, jun 2014. [26](#)

- [66] Martí Duocastella, Giuseppe Sancataldo, Peter Saggau, Paola Ramoino, Paolo Bianchini, and Alberto Diaspro. Fast Inertia-Free Volumetric Light-Sheet Microscope. *ACS Photonics*, 4(7) :1797–1804, jul 2017. [26](#)
- [67] Irina Rakotoson, Brigitte Delhomme, Philippe Djian, Andreas Deeg, Maia Brunstein, Christian Seebacher, Rainer Uhl, Clement Ricard, and Martin Oheim. Fast, multicolor 3-D imaging of brain organoids with a new single-objective two-photon virtual light-sheet microscope. *bioRxiv*, page 461335, nov 2018. [26](#)
- [68] Monya Baker. Faster frames, clearer pictures. *Nature Methods*, 8(12) :1005–1009, dec 2011. [26](#)
- [69] Butch Moomaw. Camera Technologies for Low Light Imaging. In *Methods in cell biology*, volume 114, pages 243–283. 2013.
- [70] Talley J. Lambert. Assessing camera performance for quantitative microscopy. *Methods in Cell Biology*, 123 :35–53, jan 2014. [26](#)
- [71] Chris Martin, Tianqi Li, Evan Hegarty, Peisen Zhao, Sudip Mondal, and Adela Ben-Yakar. Line excitation array detection fluorescence microscopy at 0.8 million frames per second. *Nature Communications*, 9(1) :4499, dec 2018. [26](#), [29](#)





## Chapitre 2

# Stratégie d'imagerie des cils cellulaires motiles à l'étude de la spécification de l'axe gauche-droite

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>38</b>
2.1.1	Cils cellulaires et l'asymétrie gauche-droite	38
2.1.2	La brisure de symétrie gauche-droite chez l'embryon de poisson-zèbre	43
2.1.3	Approche expérimentale : exploiter les artefacts de balayage	47
<b>2.2</b>	<b>3D-CiliaMap : quantification et analyse systématique des paramètres biophysiques des cils</b>	<b>49</b>
2.2.1	Introduction à la chaîne de traitement des données expérimentales	49
2.2.2	Acquisition des images de la vésicule de Kupffer	52
2.2.3	Enregistrement des données	59
2.2.4	Extraction des paramètres biophysiques des cils	66
2.2.5	Exploration des données et résultats biologiques	73
<b>2.3</b>	<b>Perspectives</b>	<b>82</b>
2.3.1	Vers une simulation de la vésicule de Kupffer	82
2.3.2	Amélioration de la chaîne de traitement par apprentissage automatique	84
2.3.3	Vers l'imagerie 3D dynamique des cils	86
<b>2.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>87</b>
<b>2.5</b>	<b>Références</b>	<b>87</b>

---

## 2.1 Introduction

L'origine de l'asymétrie gauche-droite aux stades précoces de développement des vertébrés est à ce jour encore débattue. Au cours du processus, l'implication des cils cellulaires, des organites en forme de bâtonnet omniprésents dans notre organisme, est centrale à la brisure de la symétrie selon cet axe. Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier l'établissement de la polarité gauche-droite chez un organisme-modèle de vertébré : le poisson-zèbre. Celui-ci présente au stade précoce, une cavité responsable du déclenchement de ces mécanismes : *la vésicule de Kupffer*, permettant de spécifier l'axe gauche-droite à partir des autres deux axes biologiques déjà établis. Son étude est rendue complexe par sa géométrie ellipsoïdale singulière et sa forte variabilité interne, mais est indispensable à la compréhension de son impact biologique sur le reste de l'organisme. Pour ce faire, nous détaillerons l'implémentation et l'amélioration d'une chaîne de traitement permettant d'extraire les paramètres biophysiques des cils et de vésicules provenant d'un grand nombre d'embryons différents, de les visualiser et de les analyser statistiquement. Nous présenterons ainsi les différentes étapes du traitement, les améliorations que nous avons apportées, ainsi que les moyens de visualisation et d'analyse statistique spécifiques à la résolution des enjeux biologiques. Grâce à ceux-ci, nous avons découvert une nouvelle forme de chiralité au sein de la vésicule, s'établissant au cours du temps.

### 2.1.1 Cils cellulaires et l'asymétrie gauche-droite

**Asymétrie gauche-droite, défauts de latéralité** Malgré une apparente symétrie, l'organisation interne des organes des vertébrés est systématiquement asymétrique. C'est en particulier le cas de la plupart des organes et du système vasculaire associé, positionnés de manière asymétrique au sein de la cavité corporelle. Parmi ceux-ci, on peut citer chez l'homme que le coeur ou la rate se trouvent du côté gauche, tandis que le foie ou l'appendice du côté droit. Les organes ainsi sont disposés de part et d'autre de l'axe gauche-droite; certains, comme le colon, sont quant à eux chiraux.

La configuration typique de la disposition des organes humains présentée figure 2.1 est la même pour l'écrasante majorité des individus : on appelle cette disposition *situs solitus*. Toutefois, il existe pour une proportion faible de la population des problèmes de latéralité pour qui cette configuration diffère, partiellement ou totalement [2]. C'est notamment le cas des individus atteints d'une affection congénitale désignée comme *situs inversus*, pour qui les organes et viscères sont inversés par symétrie miroir par rapport à la disposition classique [3–5]. Cet état est relativement rare, avec environ 1 cas sur 10 000 individus, et ne présente que peu de conséquences cliniques sérieuses en tant que tel. Il existe en revanche des configurations intermédiaires entre le *situs solitus* et le *situs inversus*, où les organes sont disposés de toute autre manière au sein de la cavité corporelle. On regroupe ces défauts sous le terme de *situs ambiguus* ou plus généralement d'*hétérotaxie* [3–5]. La figure 2.2 recense les configurations présentant ces défauts de latéralité. Dans la majorité des cas, le **situs ambiguus** est quant à lui associé à d'autres pathologies graves, à l'instar de maladies cardiaques congénitales de même que de problèmes gastro-intestinaux ou du foie [6].

En 1933, l'observation de *situs inversus* a cependant été mise en lien à d'autres symptômes cliniques récurrents, par le pneumologue Kartagener. Au défaut de latéralité pouvaient être associés deux autres symptômes : des sinusites et dilatations des bronches chroniques; ces trois symptômes forment la **triade de Kartagener** et sont caractéristiques du syndrome éponyme. La cause conjointe de la maladie n'a été identifiée qu'en 1976 par Azfelius [7]; la plupart de ses patients atteints du syndrome présentaient également des signes d'infertilité dûs au manque de motilité des flagelles des spermatozoïdes et des cils de l'oviducte. C'est ainsi que la cause, la dyskinésie ciliaire primitive (DCP) c'est-à-dire un trouble de la motilité

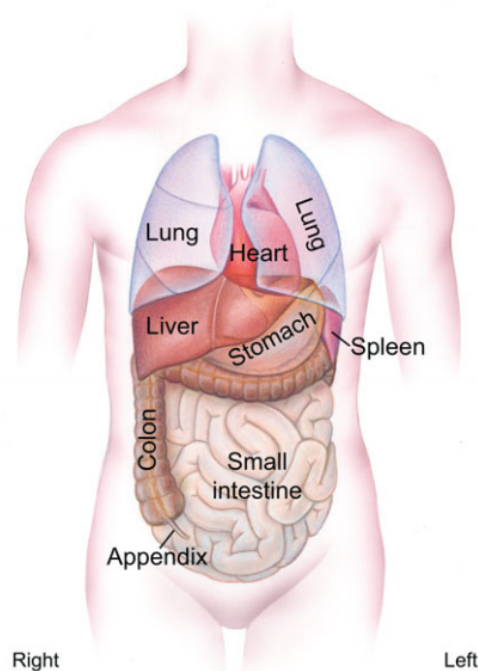


FIGURE 2.1: Disposition interne asymétrique des organes chez l'Homme, désignée comme *situs solitus*. Tiré de [1].

des cils, a pu être identifiée.

**Cils cellulaires** Les cils cellulaires et flagelles sont des extensions cytoplasmiques qui protubèrent de la plupart des cellules eukaryotes [2; 8]. Leur fonction première est la génération de flux biologiques ou plus généralement de déplacer des fluides. Comme abordé au paragraphe précédent, leur dysfonctionnement est la cause de nombreux troubles chez les vertébrés, allant de problèmes des voies respiratoires, de fertilité, de développement du cerveau et bien évidemment de défauts de latéralité [8; 9]. On regroupe sous le terme de *ciliopathies* les troubles associés à un défaut de fonctionnement des cils ; quelques-uns de ceux-ci sont présentés figure 2.3. À mesure que la recherche progresse, l'implication et le rôle des cils dans de nombreux processus se fait évident. Leur étude est donc fondamentale à la compréhension de leur fonctionnement et des mécanismes relatifs aux maladies qui leur sont associées.

**Structure** Les cils cellulaires sont des organites qui se présentent sous la forme d'une tige plus ou moins longue selon leur provenance et leur type. Leur présence abondante au sein des différents organismes ont permis la caractérisation précise de leur fonctionnement [12], de leur composition moléculaire jusqu'à leur fonction de motilité ou de détection. Ces deux fonctions sont à associer aux deux types connus de cil : les cils motiles ou vibratiles, qui sont capables de bouger activement, et les cils dit primaires passifs et non motiles, dont la fonction est sensorielle. La structure du cil cellulaire est présentée 2.4. Il est constitué pour l'essentiel de son étendue d'un complexe central cylindrique, l'axonème. Celui-ci se compose de multiples microtubules : neuf doublets sont disposés circulairement sur la face externe du cil. À l'intérieur, le cil peut contenir un doublet supplémentaire (cil 9+2), généralement caractéristique des cils motiles, ou non (cil 9+0), configuration plus typique des cils primaires [11; 13]. Cette observation n'est pas toutefois systématique : les cils 9+0 présents dans l'organisateur gauche-droite de la souris sont par exemple motiles [14]. À la jonction entre l'axonème et son

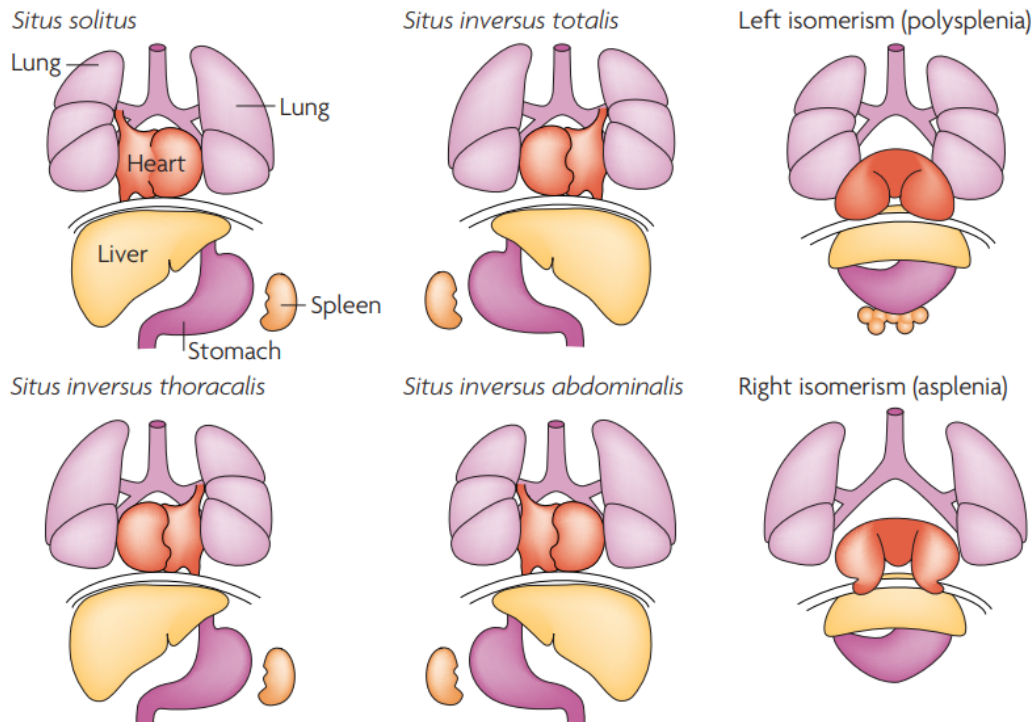


FIGURE 2.2: Schématisation des différents défauts de latéralité chez l'Homme. Tiré de [2]

implantation dans la cellule se trouve la *zone de transition*, qui aurait un rôle de filtre sélectif des molécules pouvant pénétrer dans le reste du cil. Son implantation au sein de la membrane plasmique est appelée *corps basal* et correspond à la zone où les microtubules de l'axonème s'ancrent dans la cellule.

On classe alors les cils en deux catégories : les cils motiles et les cils primaires. Les premiers sont capables de mouvement, quand les seconds sont immobiles. Les cils primaires sont omniprésents dans le corps humain : on peut trouver un unique cil à la surface de la quasi-totalité des faces apicales des cellules. Typiquement, les cils primaires sont plus courts mais ont une fonction sensorielle mécanique et chimique que ne possède généralement pas le cil motile [15]. L'importance de cette fonction a été mise en lumière par plusieurs études, son dysfonctionnement étant à l'origine de nombreuses pathologies [16]. Les cils motiles sont quant à eux regroupés au niveau de certaines surfaces épithéliales spécifiques, comme dans les voies respiratoires ou les oviductes chez la femme. Leur mouvement est produit par les moteurs moléculaires de dynéine, dont les bras joignent les doublets de microtubules adjacents. La force appliquée impose alors aux microtubules de coulisser l'un par rapport à l'autre et donc au cil de se courber. L'action conjointe de ces doublets stimulés mécaniquement permet le battement du cil dans son ensemble [17]. Il est important de noter que la chiralité intrinsèque de la structure du cil semble par ailleurs conditionner la direction de rotation de son battement [17].

**Détermination de l'axe gauche-droite** Aux stades très précoces de développement des vertébrés, le jeune embryon est rigoureusement symétrique selon l'axe gauche-droite. Celui-ci est le dernier des trois axes biologiques à s'établir ; les axes antéro-postérieur et dorso-ventral se spécifient de manière concomitante dans le temps et l'espace [18]. Les cils cellulaires motiles et immotiles ont été identifiés comme intervenant de manière directe dans la spécification de l'axe gauche-droite [19; 20], et ce chez les différents organismes modèles étudiés. Cette différenciation s'opère en différentes étapes : d'abord, un événement initial permet le déclenchement

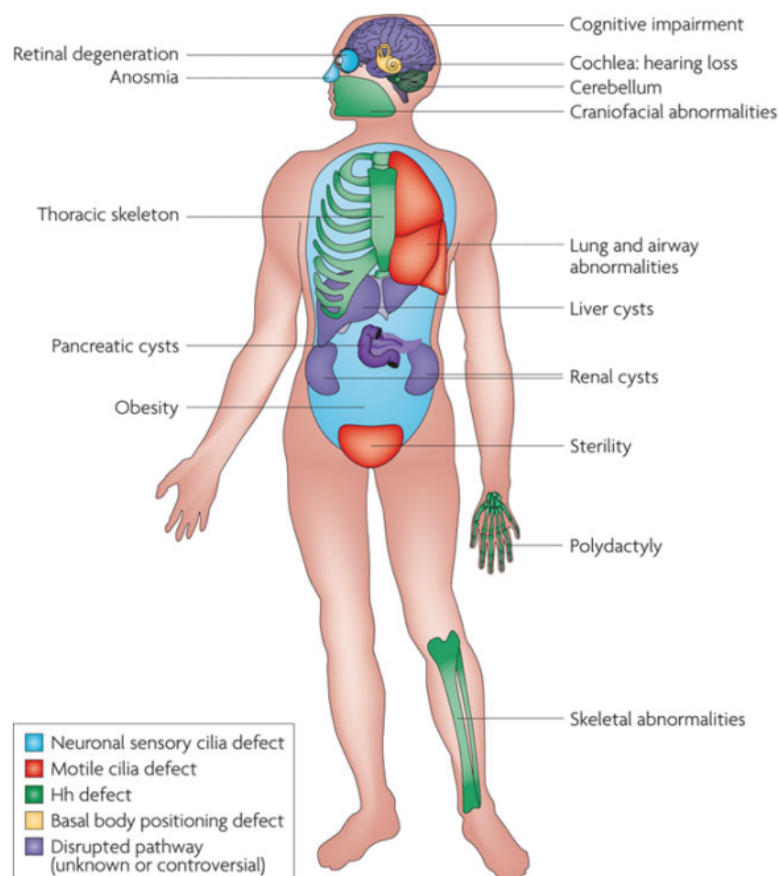


FIGURE 2.3: Exemples de troubles recensés comme ciliopathies. Tiré de [10].

de la brisure de symétrie, puis une série d'événements de transmission et d'amplification véhiculent le signal d'asymétrie au travers de l'organisme [21]. Ainsi, la littérature suggère que le flux généré par les cils cellulaires est responsable de cet événement de brisure de symétrie initial [18; 22] au sein de l'*organisateur gauche-droite*.

**Organisateurs gauche-droite** Les organisateurs gauche-droite sont des structures remarquables : ce sont des organes transitoires qui servent le seul but de rompre la symétrie, par génération et détection d'un flux asymétrique. Elles peuvent être interprétées comme des générateurs d'asymétrie à l'échelle de l'organisme. Leur fonctionnement est toutefois encore mal compris et sujet à débat. Bien qu'étant supposés le lieu de l'événement initial de brisure de symétrie, certaines études montrent que certains modèles (oiseaux, reptiles) dont la fonction de motilité des cils a été perdue, présentent tout de même l'action des mécanismes de brisure de symétrie qui en découlent [23].

Chez la souris, l'organisateur gauche-droite est appelé le *nœud* [14; 18]. L'événement de brisure de symétrie initial survient alors aux alentours de 7.5 jours de développement [24], au moyen d'un flux ciliaire directionnel asymétrique. C'est un modèle récurrent chez les mammifères et les amphibiens qui fonctionne comme suit et illustré figure 2.5 : les cellules de l'organisateur gauche-droite présentent un unique cil à leur surface ; conjointement, ils battent et génèrent un flux directionnel de la droite vers la gauche. En périphérie de ces cellules se trouvent des cils immotiles pouvant sentir le flux ainsi généré et propager l'information d'asymétrie au reste de l'organisme.

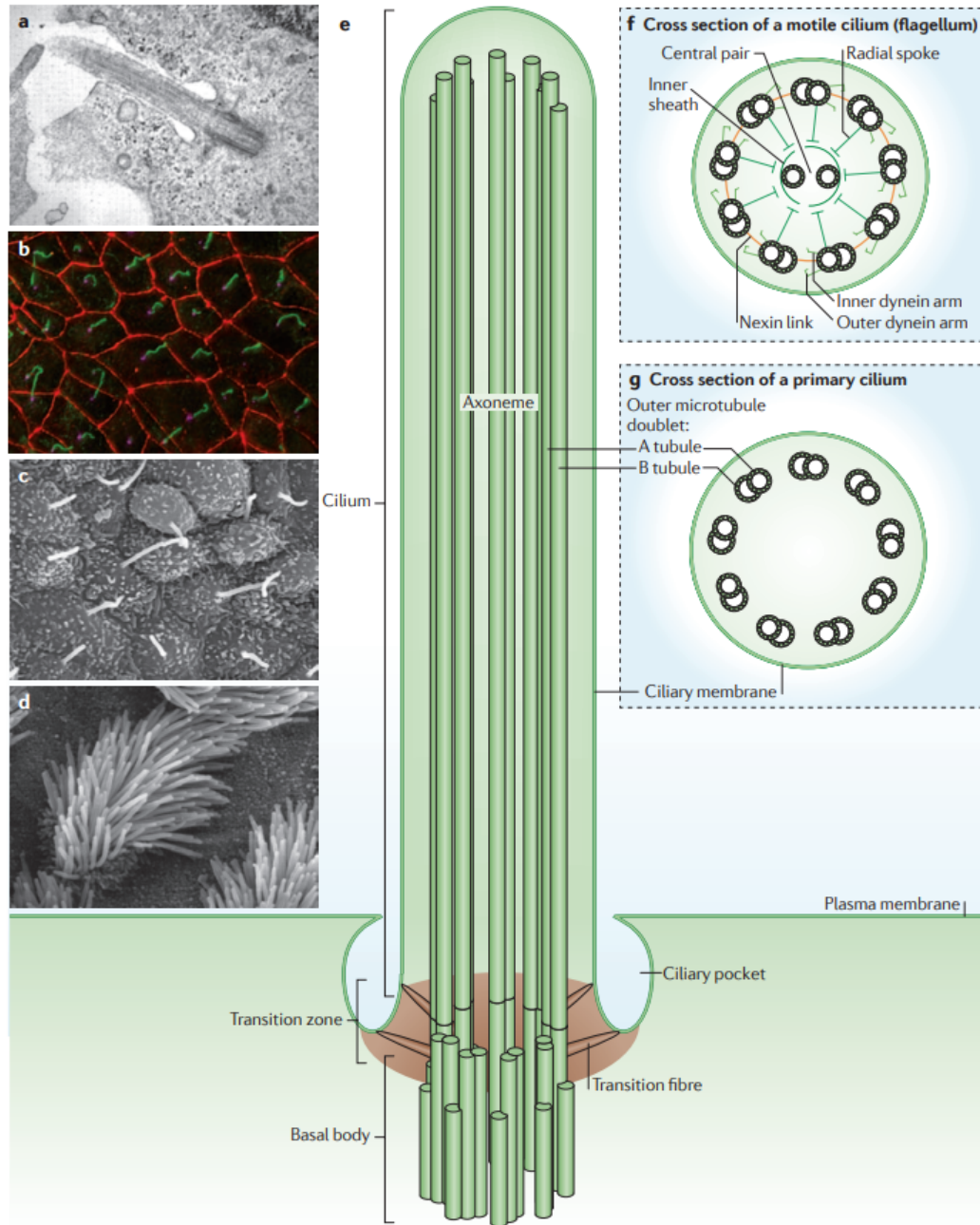


FIGURE 2.4: Schéma de la structure d'un cil cellulaire. (a) Image en microscopie électronique d'un cil primaire. (b) Imagerie des cils cellulaires primaires (vert), du contour cellulaire (rouge) et du corps basal (magenta) dans le rein. (c), (d) Images en microscopie électronique de l'organisateur gauche-droite chez la souris (c) de la trachée de souris. Tiré de [11].

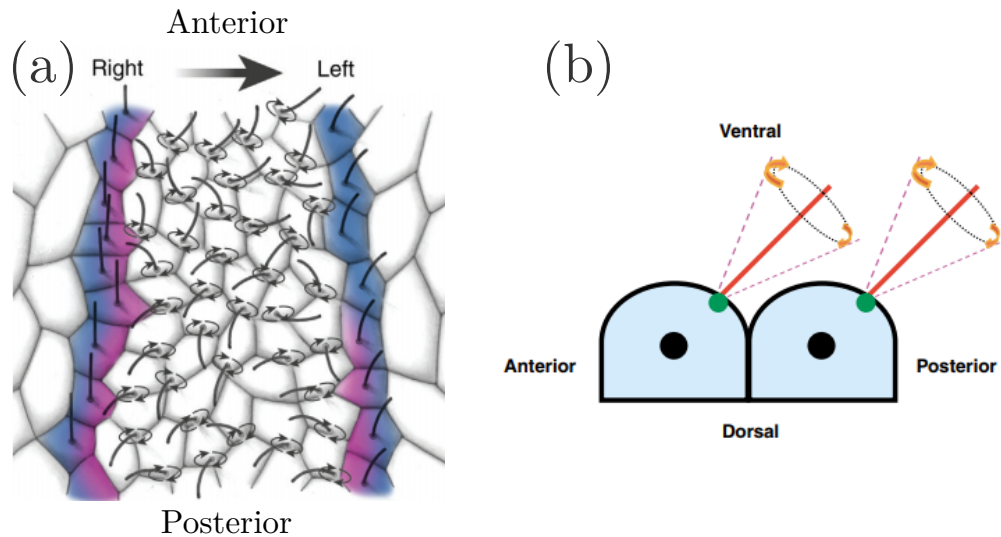


FIGURE 2.5: Évènement initial de brisure de symétrie chez la souris. (a) Flux asymétrique généré au sein du nœud par les cils motiles de l'épithélium. (b) Modèle proposé de la génération du flux directionnel, par implantation asymétrique des cils en surface des cellules. Tiré de [23; 24].

Chez le poisson-zèbre, la géométrie de l'organisateur est drastiquement différente : elle est ellipsoïdale. Dans cas, on ne peut pas réduire son fonctionnement à un problème à 2 dimensions comme chez la souris ; il est alors nécessaire de conduire une analyse en 3D. Son fonctionnement est détaillé dans la section qui suit.

### 2.1.2 La brisure de symétrie gauche-droite chez l'embryon de poisson-zèbre

Ce projet vise à étudier l'établissement de la brisure de symétrie gauche-droite chez l'embryon de poisson-zèbre. Bien que la différenciation de l'axe gauche-droite soit bien établie pour cet organisme, la provenance de la brisure de symétrie initiale au sein de l'organisateur gauche-droite, la vésicule de Kupffer, est à ce jour mal comprise. De par sa géométrie ellipsoïdale singulière et sa forte variabilité structurelle (forme, taille, cils tapissant sa surface) d'un embryon à l'autre, le modèle de l'organisateur gauche-droit du poisson-zèbre est un système complexe à étudier. Le modèle du poisson-zèbre présente de nombreux avantages, notamment à l'imagerie. Son embryon est transparent et l'étude de la vésicule de Kupffer est possible en microscopie à fluorescence. Dans cette section, nous allons détailler les contraintes inhérentes à l'étude de vésicule de Kupffer et à la compréhension de l'établissement du flux ciliaire qu'elle renferme. Ainsi, nous proposerons un cahier des charges des stratégies à adopter pour permettre son analyse.

**L'organisateur gauche-droite du poisson-zèbre : la vésicule de Kupffer** L'organisateur gauche-droite du poisson-zèbre s'appelle la *vésicule de Kupffer*. C'est un organe transitoire, visible entre 10 et 24 heures de développement, dont l'unique rôle établi est la brisure initiale de symétrie [25; 26]. Au cours de cette période, la vésicule migre lentement, en profondeur, entre la surface ventrale et le vitellus. Elle est apparente à la figure 2.6. C'est en effet une structure dynamique, dont la taille évolue d'environ 30 à 70  $\mu\text{m}$  entre les stades 3 et 14 somites [27]. La vésicule est assez profondément nichée dans l'embryon, et s'enfonce à mesure du développement : elle se trouve à une profondeur comprise entre 70 et 120  $\mu\text{m}$ , sous la couche des cellules du mésoderme. La figure 2.7 illustre le développement de l'embryon entre les stades 3 et 14 somites, période pendant laquelle la vésicule de Kupffer est observable.



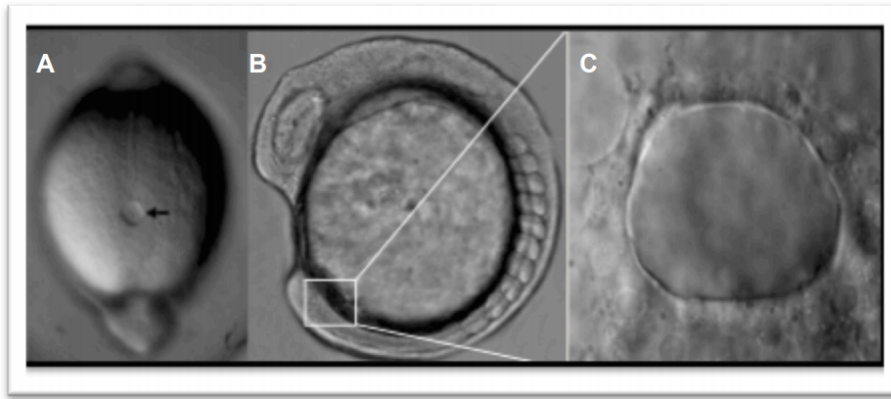


FIGURE 2.6: Imagerie en microscope à contraste interférentiel de la vésicule de Kupffer chez l'embryon de poisson-zèbre. A, C Vue dorsale de la vésicule au stade 10 somites. B Vue latérale. Tiré de la thèse de master de Rita Ferreira.

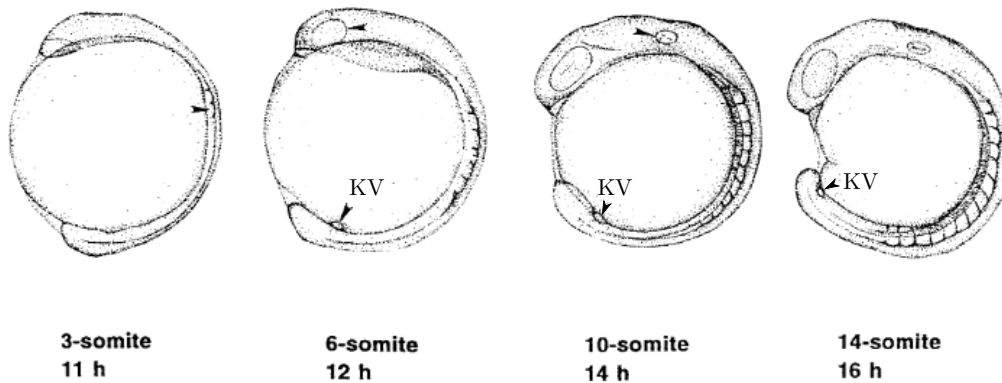


FIGURE 2.7: Développement de l'embryon de poisson-zèbre entre les stades 3 et 14 somites. On peut y voir la vésicule de Kupffer (KV) migrer au cours du développement. Tiré de [28].

Une spécificité de la vésicule de Kupffer est sa forme ellipsoïdale ; l'intérieur de la cavité est tapissé de cils motiles 9+2 répartis à sa surface (environ 50 cils par vésicule), et orientés dans toutes les directions de l'espace en 3D. Par leur battement ordonné, s'établit progressivement un flux directionnel [29] ; de manière surprenante, malgré une forte variabilité intrinsèque de la structure, de sa forme et de la disposition des cils à sa surface, la différenciation est très robuste d'un embryon à l'autre [30]. Toutefois, l'altération du comportement de battement des cils au sein de la vésicule (immotilité notamment), résulte en une prévalence plus importante d'hétérotaxie ou de *situs inversus* [31].

**Physique du cil motile** Pour comprendre les enjeux de la génération du flux directionnel au sein de la vésicule, il est important de comprendre la génération du flux d'un cil unique. Les lois qui régissent la mécanique des fluides ont été définies par Stokes en 1851 [32]. Cependant, les échelles temporelles et spatiales auxquelles s'applique le mouvement du cil imposent de redéfinir de nouveaux formalismes, à la frontière de la microfluidique, de la microbiologie et de la biologie du développement [33-36]. À cet égard, le paramètre le plus important à considérer pour répondre au problème de la génération du flux directionnel par le cil, concerne les dimensions du problème [37]. En effet, les comportements des fluides à l'échelle du cil cellulaire diffèrent drastiquement de ceux que l'on peut trouver aux échelles humaines. La

grandeur permettant d'en quantifier les effets est appelé *Nombre de Reynolds*, et permet de caractériser la nature d'un écoulement en fonction de ses échelles. Il est défini en fonction de la vitesse typique du fluide  $U$ , sa longueur typique  $L$ , sa viscosité dynamique  $\mu$  et sa densité  $\rho$  tel que suit :

$$Re = \frac{UL\rho}{\mu} \quad (2.1)$$

On peut par extension définir la viscosité cinématique telle que  $\nu = \mu/\rho$ . Le flux généré par un cil cellulaire au cours du développement du poisson-zèbre possède les échelles caractéristiques suivantes : la longueur  $L < 100 \mu\text{m}$  et la vitesse  $U < 100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . En utilisant la viscosité cinématique de l'eau, telle que  $\nu = 10^6 \text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , on obtient alors une valeur du nombre de Reynolds de  $Re < 10^{-2}$ . Le régime tel que  $Re \ll 1$  correspond à un écoulement de Stokes, ou écoulement rampant. Dans ces conditions, ce sont les forces visqueuses qui prédominent et l'écoulement présente une propriété de réversibilité, contre-intuitive aux échelles classiques. L'équation des flux de Navier-Stokes est alors linéaire, ce qui confère à ce type de flux la propriété d'additivité : le flux généré par un ensemble de cils peut être approximé comme la somme des contributions individuelles des cils isolés.

**Génération d'un flux directionnel par un cil motile** Dans cet environnement où la contribution visqueuse prédomine, les conditions de génération de flux sont plus contraignantes qu'à haut nombre de Reynolds. En effet, la propriété de réversibilité impose de rejeter tout modèle fonctionnant sur la base d'une asymétrie temporelle (théorème de la coquille Saint-Jacques [35]), ne pouvant pas produire de flux net directionnel. Pour produire un flux directionnel, il faut alors nécessairement que le mouvement du cil soit asymétrique spatialement.

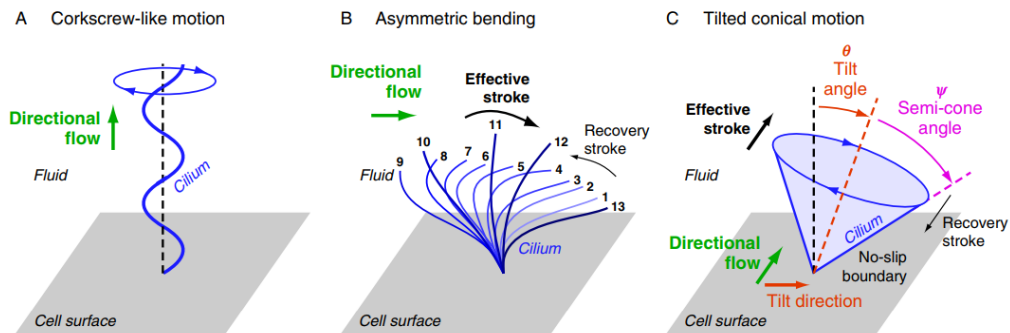


FIGURE 2.8: Modèles d'asymétries spatiales de battement d'un cil pour générer un flux directionnel à bas nombre de Reynolds. (A) Battement en tire-bouchon. (B) Battement à fléchissement asymétrique. (C) Battement conique incliné (précession). Tiré de [37].

Trois modèles ont permis de répondre à ces impératifs et proposent des mouvements à asymétrie spatiale permettant de générer un flux directionnel. Ils sont représentés figure 2.8. Le premier (a) correspond à un mouvement en tire-bouchon, qui produit un flux dans la direction du cil [19]. Le second (b) est un fléchissement asymétrique du cil. La phase effective brasse le liquide dans une direction, puis minimise son action lors de la phase de retour. Le flux généré est alors dans la direction du mouvement [38]. Ces deux modèles se basent sur une asymétrie de courbure des cils, qui n'avait pas été observé chez les cils de l'organisateur gauche-droite. Pour répondre à cette observation, un troisième modèle (c) a été proposé plus récemment [39], présentant une asymétrie spatiale pour un cil rigide : le mouvement conique incliné. Dans ce modèle, le cil précesse autour d'un axe qui n'est pas orthogonal à la surface,

mais incliné [36; 39; 40]. Ainsi, lors de la phase effective (loin de la paroi cellulaire), le cil brasse le fluide. Il minimise son action lors de la phase de retour en s'approchant de la paroi, limitant ses interactions avec le fluide. Le flux généré est alors dans la direction orthogonale à l'inclinaison de l'axe et de la paroi. Ce dernier modèle, d'abord prédit théoriquement [39] a été confirmé expérimentalement *in vivo*, chez la souris d'abord [40] puis finalement chez le poisson-zèbre dans la vésicule de Kupffer [29]. Cette configuration permet au cil unique de générer un flux directionnel dans la direction orthogonale à son inclinaison ; le flux net créé au sein de la vésicule dépend alors de la somme de leurs contributions individuelles à la surface de la vésicule.

De cette modélisation, une question fondamentale émerge alors : *dans la géométrie ellipsoïde de la vésicule de Kupffer, quelle est la configuration spatiale et des orientations des cils qui permet la génération de ce flux directionnel robuste ?*

**Comprendre la génération du flux dans la vésicule de Kupffer** La question précédente impose alors de comprendre comment peut être généré un flux dans la géométrie ellipsoïde de la vésicule. Un exemple de vésicule imagée en microscopie à fluorescence et où les cils cellulaires sont marqués, est exposée à la figure 2.9. Cette image nous renseigne alors d'une information visuelle importante : la répartition des cils de même que leur orientation par rapport à la surface de la vésicule, semblent totalement aléatoires. La vésicule est par ailleurs une structure dynamique : sa taille et sa forme varient au cours du développement et diffèrent d'un embryon à l'autre. Ainsi, il est également important de suivre la dynamique d'établissement du flux au cours de son développement.

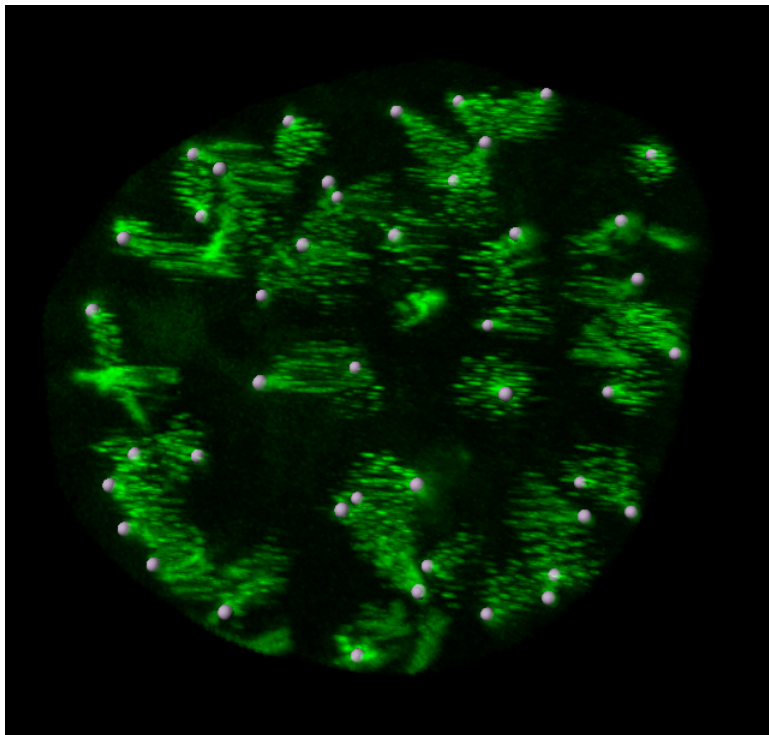


FIGURE 2.9: Image en microscopie à fluorescence d'une vésicule de Kupffer. Les cils cellulaires sont marqués. Leur base a été repérée numériquement en gris. 40x40  $\mu\text{m}$  ; marquage arl13b en GFP ; vitesse de balayage de 200 lignes par seconde.

Le véritable enjeu à l'étude de ce système est alors **sa forte variabilité** ; qu'elle soit interne, issue de la distribution spatiale des cils et de leur orientation ou structurelle, la

détermination de l'axe gauche-droite est quant à elle très robuste d'un individu à l'autre. Par conséquent, l'étude expérimentale des différents paramètres associés à la vésicule est difficile. Elle nécessite l'élaboration d'une stratégie expérimentale systématique, permettant de quantifier les caractéristiques des cils en 3D et de combiner les données de différents embryons afin d'effectuer des analyses statistiques.

### 2.1.3 Approche expérimentale : exploiter les artefacts de balayage

L'étude de la vésicule de Kupffer, intrinsèquement multi-échelle, présente un certain nombre de défis. Elle se trouve profond dans les tissus (au delà de 100  $\mu\text{m}$  de profondeur aux stades les plus tardifs), requiert une résolution tridimensionnelle de par sa forme, et est assez difficile d'accès.

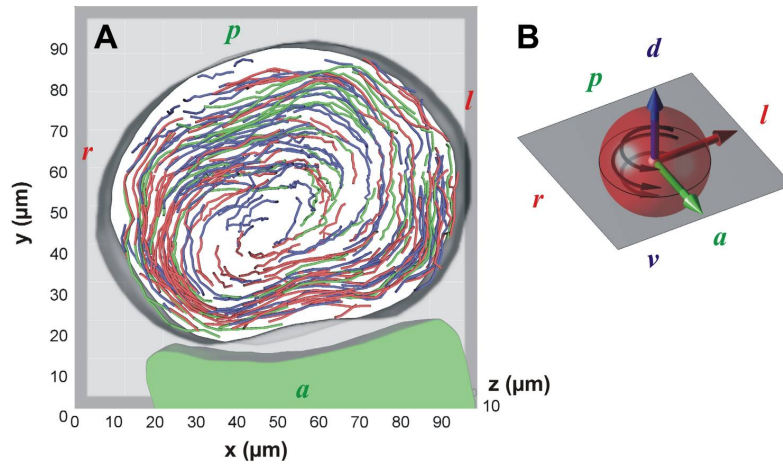


FIGURE 2.10: Quantification du flux directionnel dans la vésicule par pistage de particules. Tiré de [41]

Historiquement, la première approche utilisée pour contourner la limite de vitesse d'imagerie a été d'imager puis d'analyser quantitativement le flux généré dans la vésicule [41]. En effet, l'amplitude du flux décroît très rapidement avec la distance au cil dans un régime hydrodynamique à bas nombre de Reynolds. Ainsi, le flux est beaucoup moins rapide que le cil lui-même (environ 50  $\mu\text{m}/\text{s}$  au maximum) et peut-être imagé. Pour révéler ce dernier, Supatto et al. ont procédé à des ablations lasers localisées sur la membranes de cellules marquées en fluorescence de la vésicule, afin que celles-ci ensemencent le flux de microdébris fluorescents et permettent de le quantifier à l'imagerie. L'injection de particules était en pratique difficile au vu du faible volume de la vésicule (dizaine de picolitres). La figure 2.10 présente la quantification associée au pistage (*tracking*) 3D de ces particules imagées en microscopie confocale rapide, révélant la dynamique directionnelle du flux à l'échelle de la vésicule. La méthode a également permis la caractérisation du flux aux abords d'un cil isolé, permettant notamment d'établir qu'un flux chaotique existe proche de son battement, mais qu'un flux directionnel s'établit à quelques microns de la surface (figure 2.11). Le suivi du flux autour du cil a par ailleurs permis les premières caractérisations de ses paramètres biophysiques, en particulier son angle d'inclinaison (C de la figure 2.11).

Cependant, cette approche ne permet pas de collecter de manière systématique les paramètres biophysiques de l'ensemble des cils de la vésicule. Elle ne fonctionne bien que sur des cils isolés, où le flux n'est pas perturbé par d'autres battements environnants, ne permettant pas d'appliquer l'étude à un nombre important de cils. Par ailleurs, l'utilisation de la microscopie confocale rapide n'était alors pas optimisée à l'observation de la vésicule en profondeur et limitée aux stades précoces du développement. Il nous faut alors utiliser la

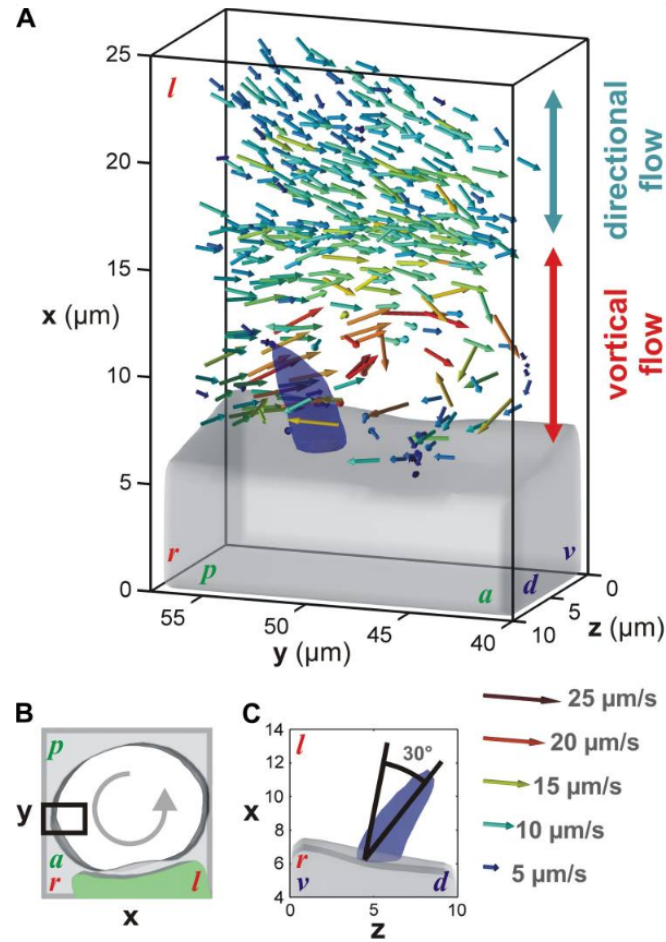


FIGURE 2.11: Quantification du flux autour d'un cil individuel par pistage de particules. (A) Quantification du flux aux abords du cil. Un flux chaotique existe proche de la surface et se mue en un flux directionnel après 15  $\mu\text{m}$ . (B,C) La rotation du flux à proximité du cil permet d'en déduire l'angle d'inclinaison. Tiré de [41].

microscopie multiphoton à balayage point par point, dont la vitesse d'acquisition est limitée. Cette technique étant bien trop lente pour résoudre le mouvement des cils motiles de la vésicule, nous avons dû considérer une approche différente permettant de caractériser les cils : l'utilisation des artefacts de balayage de leur mouvement périodique nous permettent d'extraire leurs paramètres biophysiques. Ces artefacts en forme de cône sont visibles à la figure 2.9. Grâce à ce phénomène, dû au balayage lent des lignes relativement au mouvement des cils, nous pouvons caractériser la forme de leur enveloppe de battement, au sein d'une vésicule entière.

Ce chapitre se propose alors de détailler la chaîne de traitement mise en œuvre pour répondre à cette problématique ; il vise à exposer comment nous avons combiné l'imagerie 3D, le traitement et la segmentation d'images ainsi que la mise en correspondance de données, dans le but de caractériser les paramètres biophysiques des cils et de la vésicule. De par les spécificités du problème ainsi énoncés, trois aspects sont fondamentaux à la conduite de ce projet :

1. La segmentation de l'image ; celle-ci doit permettre de repérer l'implantation et l'orientation cils dans l'espace, de même que la forme de la vésicule elle-même. La forte variabilité impose l'étude d'un nombre très important de cils et de vésicules : la procédure doit être autant que possible automatisée et systématique. Par ailleurs, elle doit être

robuste à la dégradation de résolution spatiale causée par l'imagerie en profondeur ; elle résulte en une résolution inhomogène sur l'étendue en  $Z$  de l'image.

2. La mise en correspondance des données, c'est-à-dire permettre de comparer les informations provenant d'embryons différents, de vésicules différentes. Cette condition est cruciale à l'obtention de données statistiques pertinentes et permettra d'établir le fonctionnement d'une vésicule typique.
3. La visualisation et l'analyse des données en d'un système en géométrie ellipsoïdale ; la structure hautement tridimensionnelle de la vésicule requiert des approches de visualisation avancées et spécifiques au problème.

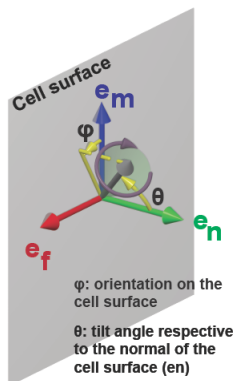
Nous avons alors développé un algorithme semi-automatisé, systématique, permettant d'extraire et de visualiser les caractéristiques critiques de l'établissement du flux au sein de la vésicule. Grâce à lui, nous avons notamment découvert une nouvelle forme de chiralité au sein de la vésicule au cours de son développement.

## 2.2 3D-CiliaMap : quantification et analyse systématique des paramètres biophysiques des cils

### 2.2.1 Introduction à la chaîne de traitement des données expérimentales

L'étude de la vésicule de Kupffer est un enjeu crucial à la compréhension de l'établissement de la polarité gauche-droite. Pour en comprendre le fonctionnement, il devient impératif de quantifier les propriétés biophysiques de la vésicule et des cils qui la tapissent, et ce, au cours du temps. Parmi ses caractéristiques, la physique du flux, son établissement et son rôle au sein de la vésicule demeurent encore largement discutés. Il apparaît alors l'importance d'extraire les paramètres biophysiques relatifs à sa génération dans la cavité par les cils qui en tapissent la surface. Le mouvement conique incliné décrit précédemment pour les cils motiles permet de générer un flux directionnel à bas nombre de Reynolds par asymétrie spatiale : le flux dépend alors directement des paramètres biophysiques des cils, qui sont regroupés à la figure 2.12. On peut citer par exemple les angles  $\phi$  et  $\theta$  caractéristiques de l'inclinaison du cil, son ouverture  $\psi$ , sa longueur  $L$ , sa fréquence de battement  $f$ . Par ailleurs, il est également important de quantifier les paramètres à l'échelle de la vésicule comme la densité de cil, la taille ou la forme de la cavité.

Paramètre biophysique	Notation	Amplitude du flux	Orientation du flux
Longueur du cil	$L$	✓	
Fréquence de battement du cil	$f$	✓	
Distribution des cils dans la cavité	$\rho$	✓	
Amplitude de l'inclinaison du cil	$\theta$	✓	
Orientation de l'inclinaison	$\phi$	✓	✓
Angle du cône de rotation	$\psi$	✓	



$\phi$ : orientation on the cell surface  
 $\theta$ : tilt angle relative to the normal of the cell surface ( $e_n$ )

FIGURE 2.12: Tableau des paramètres biophysiques à extraire de la vésicule de Kupffer.

En pratique, l'extraction de ces paramètres nous confronte à plusieurs problèmes. D'abord, la vésicule de Kupffer est une cavité de forme ellipsoïdale, dont l'intérieur est tapissé de cils

motiles répartis à sa surface, et orientés dans toutes les directions de l'espace en 3D. Cette géométrie atypique requiert une analyse adaptée à la conformation spatiale tridimensionnelle de la cavité. Par ailleurs, on observe rapidement que les paramètres biophysiques détaillés précédemment sont très variables malgré une spécification gauche-droite robuste. Dans ces conditions, l'analyse doit pouvoir agréger un nombre important de cils et de vésicules afin d'estimer quantitativement leur influence. La chaîne de traitement doit alors permettre la mise en forme des données afin de mettre en correspondance de l'information provenant d'embryons différents, afin d'en quantifier les caractéristiques.

**Amélioration de la chaîne de traitement** Lors de mon arrivée en thèse en 2016, un prototype de la chaîne de traitement avait déjà été conçu par Willy Supatto, permettant l'extraction de ces paramètres biophysiques de manière semi-automatisée. De cette analyse, certains résultats biologiques ont pu être regroupés dans un premier article [42]. Parmi ceux-ci, l'étude a pu révéler que l'inclinaison méridionale des cils à la surface de la vésicule est responsable de la génération du flux rotationnel autour de l'axe dorso-ventral, brisant la symétrie gauche-droite. Par ailleurs, il a pu être confirmé un fort gradient de densité de cils vers le pôle antérieur de la vésicule. Ces résultats ont permis d'apporter des éléments de réponse pertinents à la question des mécanismes physiques utiles à l'établissement de l'asymétrie, et à la détection du flux au sein de la vésicule. La modélisation et à l'analyse quantitative suggèrent qu'il est peu probable que les cils motiles soient sensibles mécaniquement au flux généré dans la vésicule. En revanche, la possibilité que le flux soit détecté mécaniquement par les quelques cils immotiles présents reste plausible, de même que l'hypothèse de la prévalence d'un mécanisme chimio-sensoriel.

Dans le projet présenté dans ce chapitre, nous avons voulu contrôler de manière plus systématique toutes les formes de chiralité présentes au sein de la vésicule. Pour ce faire, il a été nécessaire de développer une procédure de quantification et d'analyse statistique. En effet, la forte variabilité intrinsèque des paramètres biophysiques impose la superposition de l'information biologique d'un nombre conséquent de vésicules et de cils et donc l'analyse d'un nombre important de données. Bien que permettant l'extraction de certains paramètres, cette version de la chaîne de traitement était alors fastidieuse à exécuter : pour chaque vésicule, il fallait compter plusieurs jours complets d'analyse manuelle. Il était alors impératif d'améliorer l'intégration des différentes étapes de la chaîne de traitement afin de la rendre plus rapide, intuitive et efficace, et permettre l'étude quantitative et statistique des enjeux biologiques du problème.

Le but du projet était alors de rendre compatible la chaîne de traitement avec une analyse systématique à grande échelle. Les travaux détaillés dans la suite s'articulent autour de deux axes principaux : d'abord, faciliter et accélérer le traitement afin de pouvoir agréger un grand nombre de données et permettre les études statistiques. Ensuite, extraire de nouveaux paramètres biologiques des images acquises. La figure 2.13 expose les différentes étapes du traitement décrits dans la suite de ce chapitre. Celui-ci s'organise en 4 étapes clés et interdépendantes :

1. L'acquisition des données, permettant la génération de deux images 3D utiles à l'analyse. [2.2.2](#)
2. La mise en correspondance des données, permettant de superposer et de comparer les données provenant d'échantillons biologiques différents. [2.2.3](#)
3. L'extraction des paramètres, permettant de tirer les paramètres biophysique des images acquises. [2.2.4](#)
4. L'exploration des données, qui consiste en la visualisation et l'analyse statistique des paramètres ainsi extraits. [2.2.5](#)

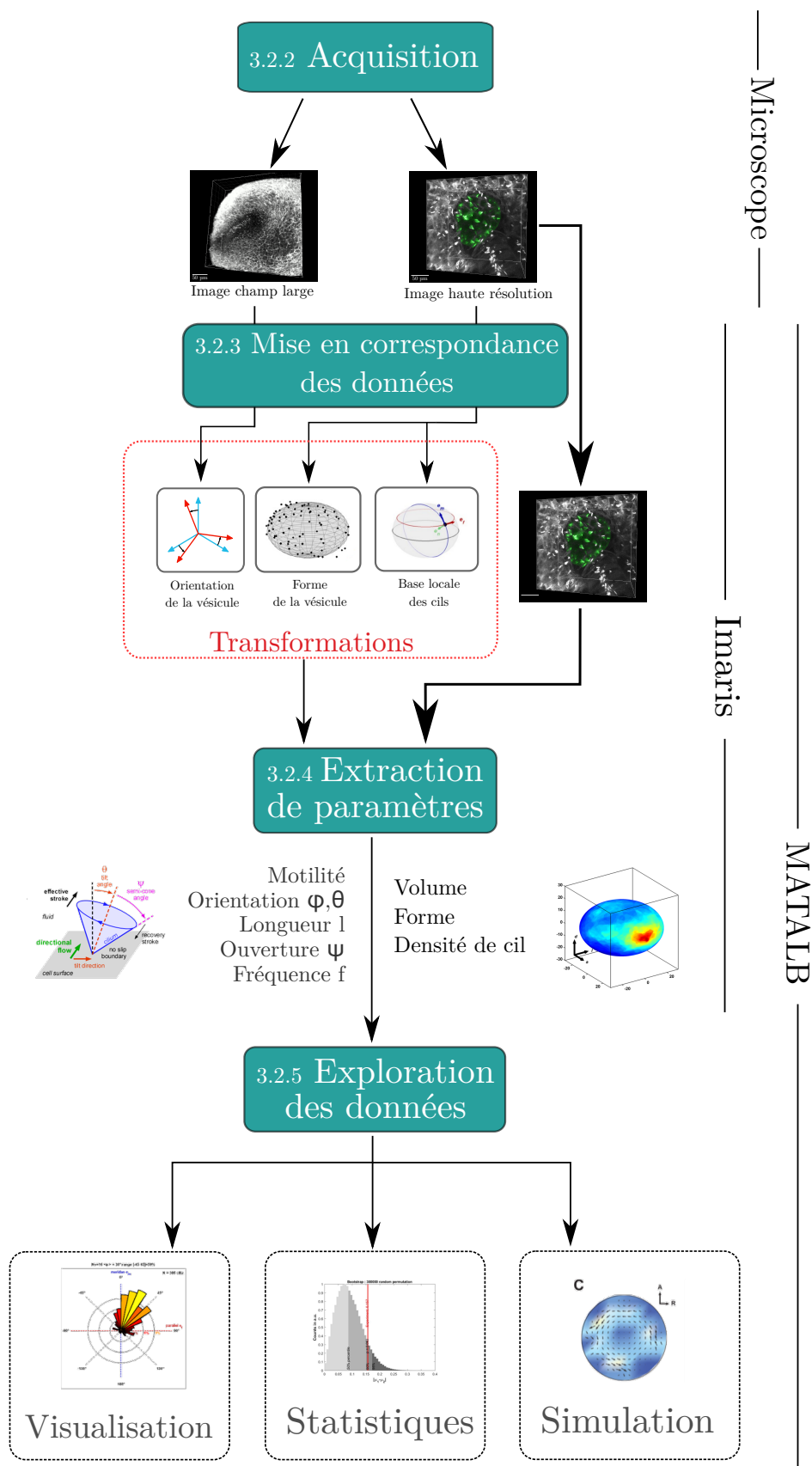


FIGURE 2.13: Diagramme de la chaîne de traitement à l'analyse des paramètres biophysique de la vésicule de Kupffer.



**Interface Imaris/Matlab** La chaîne de traitement décrite dans la suite de ce chapitre utilise, en plus du microscope nécessaire à l'acquisition, deux logiciels : Imaris, pour la visualisation et la manipulation des données dans l'espace, et MATLAB, pour toute la partie de traitement numérique.

**Imaris** est le leader mondial des logiciels de visualisation, segmentation et interprétation de jeux de données en microscopie 3D et 4D (3D + temps). Ce logiciel développé par la société suisse Bitplane, permet la manipulation interactive des jeux de données de la vésicule, ainsi que de repérer manuellement un certain nombre de paramètres (position, orientation etc.).

**MATLAB** est un logiciel de calcul numérique, permettant notamment de manipuler des matrices, afficher courbes et données, ainsi que de mettre en œuvre des algorithmes. La plupart du traitement se fait alors au moyen d'algorithmes codés dans ce langage. Utilisés conjointement, ils permettent une analyse intuitive et visuelle (via Imaris), mais aussi largement automatisée (via MATLAB) de la vésicule de Kupffer. Dans la pratique, ces deux logiciels peuvent communiquer et échanger des objets numériques via l'interface ImarisXT. Grâce à celle-ci, il est possible d'appeler des scripts MATLAB directement via Imaris, et réciproquement de conduire des analyses numériques sur les objets provenant Imaris à partir de MATLAB.

Dans la suite de ce chapitre, nous aborderons séquentiellement chaque étape de l'analyse décrite à la figure 2.13.

## 2.2.2 Acquisition des images de la vésicule de Kupffer

**Préparation des échantillons** Les échantillons utilisés pour l'imagerie *in vivo* sont issus d'une lignée transgénique de poissons zèbres, qui exprime la protéine fluorescence GFP (actb2 :arl13b-GFP) localisée dans les cils cellulaires [43]. Chaque embryon a par ailleurs été baigné dans une solution de BodipyTR, révélant le cytoplasme en rouge à l'imagerie. Afin de suivre la dynamique d'évolution des paramètres de la vésicule, les images seront dépendamment acquises sur des embryons entre les stades 3SS et 14SS.

**Microscopie multiphoton** La vésicule étant nichée profondément dans l'embryon, il est nécessaire d'utiliser la microscopie de fluorescence excitée à 2 photons, afin d'imager en profondeur dans les tissus. Deux microscopes ont été utilisés pour l'imagerie durant ce projet : le TCP SP5 ou SP8 direct de chez Leica Inc. fonctionnant à une longueur d'onde d'excitation de 930 nm (Chameleon Ultra Laser, Coherent Inc.). Ces microscopes sont munis d'un objectif x25 à immersion dans l'eau (à faible grossissement), d'ouverture numérique 0.95. (Leica, 25x, 0,95 NA). Le signal de fluorescence est recueilli au moyen de deux détecteurs. Un premier permet de collecter les longueurs d'onde comprises entre 493 et 575 nm, pour la détection de la GFP provenant des cils. Un second permet la détection des longueurs d'ondes comprises entre 594 et 730 nm, ici spécifique du cytoplasme. Ainsi, les acquisitions ont alors nécessité deux canaux distincts : le vert pour les cils et le rouge pour le cytoplasme.

**Acquisitions multi-échelles** Pour l'analyse des vésicules, deux images complémentaires à des échelles distinctes sont utilisées et permettent le traitement par la suite. Elles sont exposées figure 2.14 et se définissent ainsi :

- Une acquisition grand champ de vue (faible résolution spatiale) de l'embryon entier (a), permettant d'en déterminer l'orientation générale. Typiquement, le champ de vue de ces images est de  $600 \times 600 \times 150 \mu m^3$  de volume avec un voxel de dimensions  $1.15 \times 1.15 \times 5 \mu m^3$ .

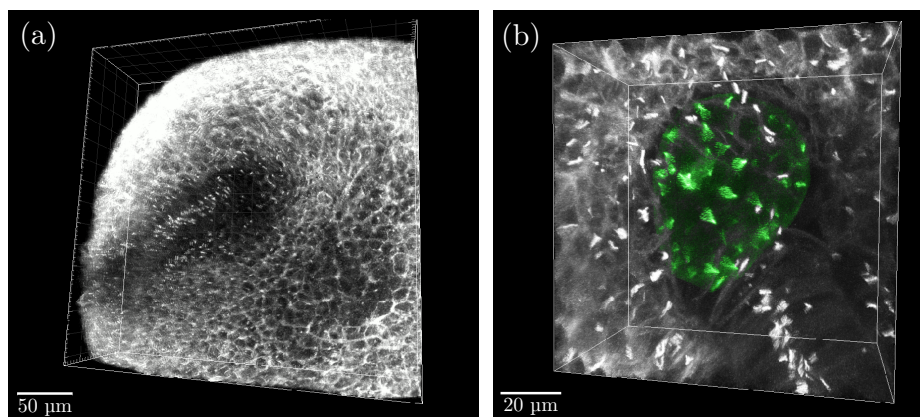


FIGURE 2.14: Les deux types d'acquisition nécessaires à l'analyse de la vésicule. (a) est une image champ large, basse résolution de l'embryon, permettant de repérer les axes biologiques et l'orientation de la vésicule. (b) est une image haute résolution centrée sur la vésicule, permettant d'extraire les informations quantitatives de la cavité. La vésicule segmentée a été colorée en vert numériquement.

- Une seconde acquisition haute-résolution, de la vésicule de Kupffer uniquement (b). Celle-ci sera utilisée pour l'analyse par la chaîne de traitement et permet de quantifier la distribution et l'orientation des cils en 3D. Typiquement, l'acquisition se fait sur un volume de  $100 \times 100 \times 50 \mu\text{m}^3$ , avec un voxel de dimensions  $0.2 \times 0.2 \times 0.8 \mu\text{m}^3$ . Le temps passé par pixel est toujours le même et fixé à  $2.4 \mu\text{s}$ , pour une fréquence d'acquisition de ligne avoisinant les 200 Hz. Cette dernière a été choisie volontairement faible pour maximiser le rendu de l'artefact de balayage à l'imagerie des cils.

Il est à noter qu'il est crucial pour la suite que les deux acquisitions soient obtenues pour une orientation strictement identique de la vésicule. Ainsi, les deux images doivent être prises immédiatement l'une à la suite de l'autre afin d'éviter que cette dernière ne bouge. En effet, à ce stade, la vésicule se développe et migre rapidement le long du poisson : attendre trop longtemps pour la seconde acquisition aurait pour effet de modifier son orientation absolue dans les axes du microscope. Par ailleurs, la figure 2.15 démontre que l'utilisation de deux canaux rouge et vert permet l'identification de la vésicule par contraste inversé, et notamment de la segmenter, ainsi que de repérer plus facilement les cils affleurant à la surface de la cavité.

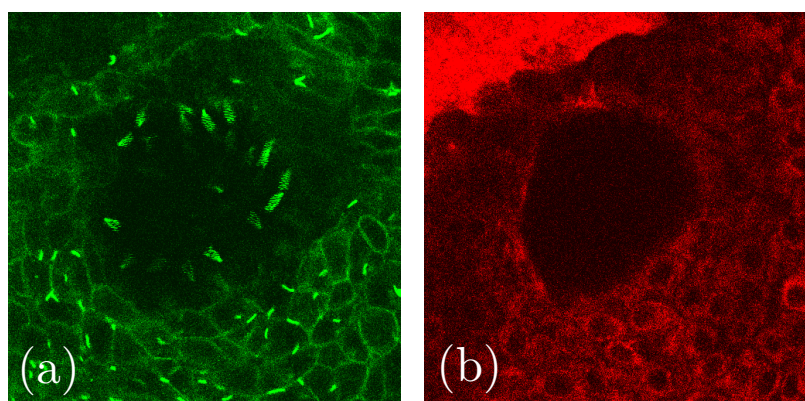


FIGURE 2.15: Images provenant des deux canaux d'imagerie de la vésicule. (a) Canal vert, repérant les cils cellulaires et plus généralement l'actine (arl13b, GFP). (b) Canal rouge, repérant le cytoplasme (BodipyTR).

**Artefact de balayage** Dans l'introduction, nous discutons l'importance d'imager rapidement, afin que l'image rende compte de la réalité biologique. Dans ce projet et avec les moyens utilisés, les acquisitions que nous réalisons sont loin d'être assez rapides pour résoudre le mouvement des cils cellulaires. Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre introductif, cela génère à l'image un artefact de balayage, que nous allons ici exploiter pour la quantification des paramètres biophysiques des cils.

Les cils motiles battent à une fréquence de l'ordre 20 à 50 Hz, c'est à dire qu'ils effectuent une rotation complète de leur mouvement de précession en quelques centièmes de secondes. Comme décrit précédemment, les images de la vésicule sont obtenues par un balayage classique XYZT du volume ((a) de la figure 2.16), avec une fréquence par ligne d'environ 200 Hz. On constate que d'une ligne à l'autre, il s'écoule pour les cils les plus rapides jusqu'à  $\frac{1}{4}$  de cycle. En considérant qu'un cil s'étend sur 5  $\mu\text{m}$ , soit 25 pixels, on comprend alors que le cil aura le temps d'effectuer plusieurs rotations complètes durant le temps de son acquisition. Il en résulte qu'à l'image l'on n'observe pas l'allure réelle du cil mais l'enveloppe du battement par précession : c'est l'**artefact de balayage** (b).

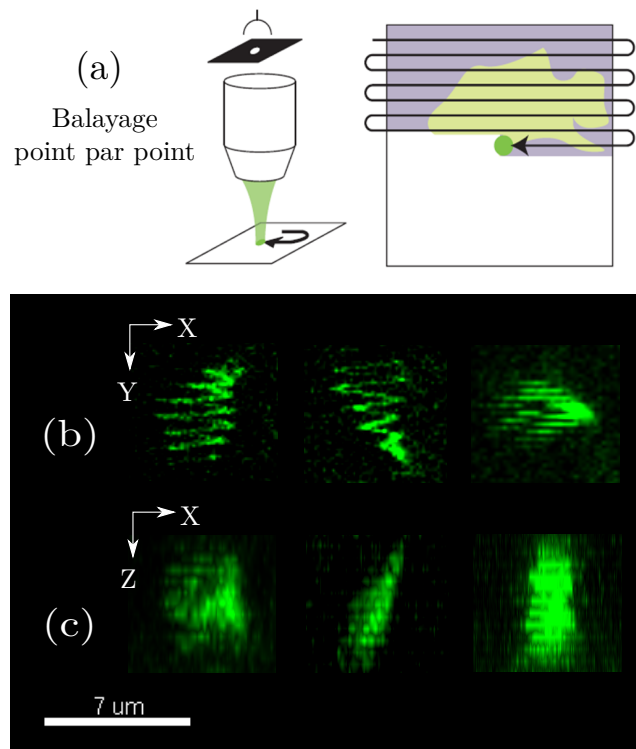


FIGURE 2.16: Principe des artefacts de balayage lors de l'imagerie des cils. (a) La méthode de balayage XYZT consiste à balayer séquentiellement tous les voxels de l'image, les uns après les autres. Si la fréquence d'imagerie est trop lente au regard de la fréquence de battement des cils, on voit apparaître des artefacts de balayage à l'acquisition. (b) Différentes formes d'artefacts de balayage dans le plan (xy). On observe nettement les lignes artefactuelles liées au rapport entre la fréquence de battement des cils et la fréquence d'imagerie. Dans ce plan, on distingue clairement l'enveloppe conique du battement par précession. (c) Différentes formes d'artefacts de balayage dans le plan (xz). La résolution en Z étant bien moins bonne qu'en X ou Y, l'enveloppe est beaucoup moins apparente. Il en résulte une tache dont la forme est difficilement extractible. Dans la suite, on préférera travailler dans le plan (xy) pour les différentes caractérisations.

Bien que l'on ne résolve pas le mouvement du cil dynamiquement, l'information de l'en-

veloppe est chargée en information : sur l'orientation du cil d'abord, mais aussi sa longueur et son ouverture. Grâce à la figure 2.16 on remarque aisément la différence de résolution dans la dimension X/Y et dans la dimension Z. En X et Y, dont les formes typiques d'artefacts sont illustrées en (b), on peut aisément extraire de l'enveloppe les informations d'orientation, de longueur ou d'ouverture. En revanche, sur les images exposant les artefacts dans la direction Z (c), il est beaucoup moins évident de repérer la forme générale du battement du cil à cause du manque de résolution. Ainsi, dans la suite, nous utiliserons préférentiellement les projections dans le plan (xy) dans le but d'extraire, avec une bonne précision, les paramètres biophysiques du cil. L'artefact de balayage permet par ailleurs, à condition de connaître avec précision la fréquence ligne à ligne d'acquisition, de déduire la fréquence de battement du cil. Tous ces paramètres sont autant d'informations qu'il conviendra d'extraire puis d'étudier dans la suite de la chaîne de traitement afin de comprendre la génération du flux et la brisure de symétrie à l'échelle de la vésicule.

**Simulations de cils individuels** Comme il le sera détaillé plus tard dans ce manuscrit, il y a de nombreux avantages au développement de simulations, à la fois de cils individuels comme de vésicules entières. D'abord, elles permettent de valider le modèle de battement du cil en comparant les artefacts obtenus par simulation et à l'imagerie. Ensuite, les simulations sont plus généralement un moyen d'étalonner la performance (exactitude, précision) des différentes étapes de la chaîne de traitement. Il est alors possible de comparer les paramètres extraits par celle-ci avec les paramètres initiaux de simulation dont on connaît strictement la valeur. La formation des lignes de ces artefacts n'est pas aléatoire : le schéma obtenu à l'image dépend rigoureusement du mode d'acquisition de ses paramètres (taille de l'image, fréquence de balayage), ainsi que des cils imagés (fréquence de battement, orientation). De fait, il est possible de reproduire numériquement le mode d'acquisition XYTZ en modélisant le cil par un bâtonnet rigide précessant autour d'un axe. Dans la suite, nous développerons la génération de simulation d'un cil unique.

L'intégralité de la procédure de simulation est décrite par la figure 2.17. Comme illustré, pour simuler une image obtenue par acquisition XYZ au microscope, on utilise trois objets numériques différents : une matrice du cil brute, une matrice du cil convoluée par la PSF (réponse impulsionnelle spatiale), et l'image simulée de l'acquisition. D'abord, la représentation du squelette du cil, qui correspond à la réalité biologique simplifiée de l'échantillon, prend la forme d'une matrice 3D. Cette matrice brute représente le cil sous la forme d'un bâtonnet rigide, précessant autour de son axe : l'intensité des voxels est nulle où le cil n'est pas et de 1 lorsque ce voxel est sur la trajectoire du cil. Ensuite, est apposée la contribution de la tache focale du microscope sur une seconde matrice. Celle-ci représente l'image que l'on obtiendrait si l'on pouvait conduire l'acquisition avec une vitesse d'imagerie infinie. Elle correspond alors à la matrice brute, convoluée par la PSF dans les trois dimensions. Enfin, la dernière matrice, de même taille, correspond à l'image de l'acquisition telle qu'elle est obtenue par imagerie XYZ. Pour chaque voxel successivement (dans l'ordre XYZ) on estime la quantité de signal qui est collectée à l'instant  $t$  du passage du laser sur ce voxel. Si l'étendue du cil passe proche de ce voxel (c'est à dire si une partie du signal de la PSF du cil atteint spatialement ce voxel), alors son intensité sera non-nulle (cas (c)). À l'inverse, si à cet instant le cil est dans une phase du mouvement où il n'intersecte pas le voxel concerné, aucun signal ne sera collecté et le voxel sera d'intensité faible (cas (b)). Naturellement, après chaque nouveau voxel balayé le cil aura continué sa rotation pendant le temps de collection du microscope : chaque voxel voit alors une position différente du cil dépendamment de la phase de son cycle. Nous reproduisons alors strictement la procédure d'acquisition du microscope, mais numériquement.

En pratique, la première étape consiste alors à générer le squelette du cil, la matrice brute. Nous modélisons alors le cil par un bâtonnet rigide, défini par ces quelques paramètres :

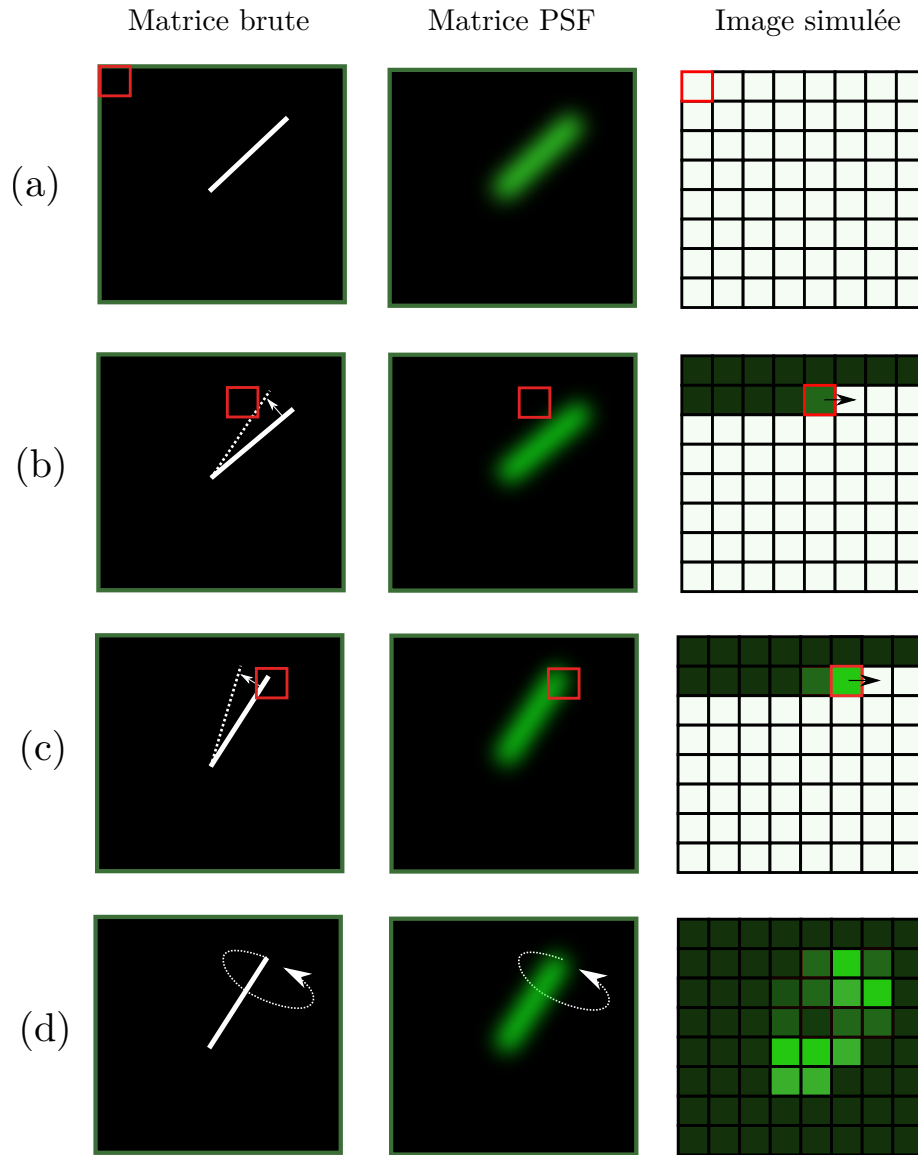


FIGURE 2.17: Principe de fonctionnement de simulation d'un cil unique. Trois matrices sont nécessaires à la reproduction des images. D'abord, une matrice brute représentative du squelette du cil simplifié. Puis, une seconde matrice du cil convolué par la PSF du système. Enfin, la matrice d'acquisition telle qu'elle serait acquise par imagerie XYZ. (a) Création des matrices et établissement des conditions initiales du cil, dans une position aléatoire sur le cône de précession. (b) Assigner séquentiellement les valeurs de chaque pixel. Dans ce cas, le signal du cil convolué par la PSF n'atteint pas le voxel considéré : son intensité est alors faible. (c) Après avoir subi la rotation correspondant au mouvement du cil durant l'acquisition du voxel précédent, le cil est désormais illuminé par le laser : le voxel est d'intensité forte. (d) Lorsque tous les voxels ont été balayés, on obtient une image 3D de l'artefact d'acquisition du cil.

- Son origine  $P = (x, y, z)$
- Sa longueur  $L$  en  $\mu\text{m}$
- L'orientation unitaire de l'axe de rotation  $\mu$  dans l'espace, aussi définie par les angles en coordonnées sphériques  $\phi$  et  $\theta$ .
- Sa fréquence de battement  $f_{\text{cil}}$
- Son angle de demi-ouverture  $\psi$

Par ailleurs, d'autres paramètres dépendant de l'acquisition sont aussi à définir :

- La forme de la PSF en X/Y et en Z :  $\text{PSF}_{X,Y,Z}$
- L'étendue de l'image en voxels  $n_{X,Y,Z}$
- L'échantillonnage spatial  $\delta x, y, z$
- La fréquence de balayage par ligne  $f_{\text{balayage}}$ . On négligera ici le temps de retour du faisceau : le temps passé par voxel correspond au rapport entre le temps passé par ligne et le nombre de voxels de la ligne.

Pour l'exemple, définissons un cil de longueur  $L = 5 \mu\text{m}$ , suivant X tel que  $\mu = (1, 0, 0)$ , de fréquence  $f_{\text{cil}} = 42 \text{ Hz}$ , d'ouverture  $\psi = 20^\circ$  et dont l'origine est au centre de l'image. De la même manière, nous définissons les paramètres du microscope comme suivant : l'extension de la PSF à 1/e telle que  $\text{PSF}_{X,Y} = 1 \mu\text{m}$  et  $\text{PSF}_Z = 4 \mu\text{m}$ , un échantillonnage spatial de  $\delta x = \delta y = 0,2 \mu\text{m}$  et  $\delta z = 0,8 \mu\text{m}$ , une fréquence de balayage de  $f_{\text{balayage}} = 200 \text{ Hz}$  pour une image de dimension  $(n_X, n_Y, n_Z) = (600 \times 600 \times 200)$  voxels. La **matrice brute** du cil est alors générée comme suivant :

1. Générer une matrice 3D vide, de dimension  $16 \times 16 \times 16 \mu\text{m}$ , d'échantillon spatial  $\delta x, y, z$  dans les directions X, Y et Z. Ainsi, la matrice contient forcément l'intégralité du cil de  $5 \mu\text{m}$  peu importe son orientation dans l'espace.
2. Modéliser le cil dans cette matrice par une ligne de voxels d'intensité 1 dans l'espace 3D suivant une orientation aléatoire du mouvement de précession autour de l'axe  $\mu$ .
  - (a) Calculer la position de l'origine du cil dans l'espace (centre de l'image) ; en déduire les coordonnées de son origine dans la matrice.
  - (b) Calculer la position de l'extrémité du cil dans l'espace en considérant un mouvement de précession autour du vecteur  $\mu$ , d'angle de demi-ouverture  $\psi$ . On considérera que le cil commence la précession à une phase aléatoire de la rotation.
  - (c) Déduire les coordonnées de l'extrémité du cil dans la matrice.
  - (d) Assigner une intensité 1 aux voxels traversés par la ligne joignant ses extrémités.

La seconde matrice est alors la matrice brute convoluée par la PSF dans les trois dimensions (figure 2.17 matrice PSF). C'est alors à partir de celle-ci que l'on remplit la **matrice d'acquisition**, par la méthode suivante :

1. Générer une matrice 3D vide de même nombre de voxels que la matrice PSF.
2. Assigner la valeur d'intensité comme suit, de chaque voxel de l'image balayé séquentiellement dans l'ordre de dimension XYZ :
  - (a) Calculer la position de l'origine du cil dans l'espace (centre de l'image), en déduire les coordonnées de son origine dans la matrice.
  - (b) Estimer la valeur d'intensité de la tache du cil qui parvient jusqu'au voxel considéré.
  - (c) Assigner au voxel cette valeur d'intensité.
  - (d) Appliquer la rotation du cil correspondant au mouvement qu'effectue le cil en le temps qu'il faut pour acquérir un voxel.
  - (e) Passer au voxel suivant et recommencer la procédure jusqu'à la fin de l'image.

Les résultats de ces simulations sont illustrés figure 2.18. Ces images permettent la validation empirique de la pertinence de la procédure : les images simulées et réelles sont très semblables, aussi bien sur les plans 2D dans la dimension Z. Nous disposons ainsi d'un outil puissant permettant l'étalonnage des performances des algorithmes de détection détaillés plus loin dans ce manuscrit.

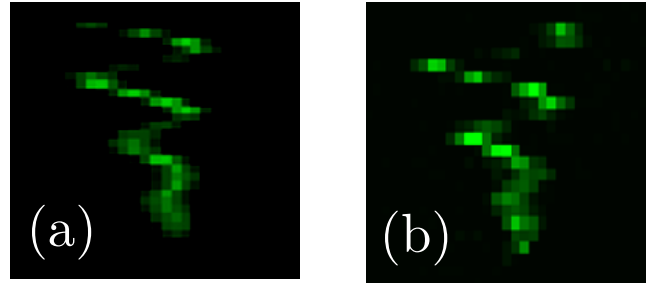


FIGURE 2.18: Comparaison de l'acquisition d'un cil réel avec une simulation. (a) Acquisition simulée pour un cil d'ouverture  $\psi = 20^\circ$ , de fréquence  $f_{\text{cil}} = 42$  Hz, et une fréquence de balayage de ligne  $f_{\text{balayage}} = 200$  Hz, orienté suivant l'axe vertical. (b) Acquisition réelle au microscope, d'un cil provenant d'une vésicule au stade 8ss.

**Rapport Signal à Bruit (RSB)** Le dernier paramètre important à considérer, au-delà des paramètres intrinsèques au cil à et l'acquisition, est la qualité globale de l'image finale. La procédure de simulation permet de générer un cil parfait dénué de tout bruit ou altération du signal. Pour se conformer au mieux à la réalité physique d'une acquisition et permettre un étalonnage plus pertinent des algorithmes dans la suite, permettre la modification du RSB final par l'ajout de bruit est alors fondamental. La modélisation des sources du bruit lors de l'acquisition par le microscope est complexe [44] : il faut considérer les contributions multiples des bruits liés au laser, aux optiques, puis à toute la chaîne d'amplification électronique (PMT, gain etc.). Dans la suite, nous avons choisi d'appliquer une version simplifiée de ce modèle qui, visuellement, s'apparente aux images obtenues par le microscope. La procédure est en trois étapes, à partir de l'image d'acquisition obtenue précédemment :

1. Ajout d'un niveau de signal moyen  $b$  constant sur toute l'image.
2. Génération d'un bruit Poissonnien assimilable à un bruit de Schottky retournant le nombre de photons  $N$  parvenant au détecteur à partir de l'image. Il correspond à la variabilité intrinsèque du flux de photons due à sa nature corpusculaire. Plus le niveau de signal est élevé, plus l'écart-type du bruit est fort. Ainsi, le bruit est d'autant plus fort par le niveau de signal est élevé. Sur Matlab, on utilise la fonction `imnoise`.
3. Application d'un filtre binomial de probabilité  $p$ , modélisant la détection probable d'un photon. L'intensité du voxel correspond alors au nombre de photons incidents, dont la détection de chacun est probable avec une probabilité  $p$ . Sur Matlab, on utilise la fonction `binornd`.

À ce stade, on peut alors définir le Rapport Signal à Bruit (RSB) de l'image. Traditionnellement et dans la littérature du traitement de l'image, on peut définir le RSB comme étant le rapport entre la moyenne du signal utile  $\mu$  et l'écart-type du bruit  $\sigma$ . Dans notre exemple, nous pouvons précisément segmenter la région utile de cil du reste grâce à l'image initiale qui ne comporte pas de bruit. De ceci, il est possible de calculer la moyenne du signal utile  $I_{\text{moy}}$ . Par ailleurs, l'écart-type d'un bruit poissonnien est théoriquement en  $\sqrt{\lambda}$  où  $\lambda$  est le nombre d'occurrence. Dans notre cas,  $\sigma = \sqrt{b}$ . Nous pouvons finalement établir le Rapport Signal à Bruit comme étant le rapport du signal provenant du cil sur la contribution du niveau de signal moyen  $b$  appliqué :

$$\text{RSB} = \frac{\mu}{\sigma} = \frac{I_{\text{moy}}}{\sqrt{b}} \quad (2.2)$$

En modulant la contribution du signal de fond, ainsi que l'intensité maximale de l'image parfaite, on a alors une influence directe sur le RSB de l'image en sortie. La figure 2.19 illustre la modulation du RSB et l'aspect visuel des images résultantes. Les images ainsi obtenues permettent de simuler un grand nombre de cils, rapidement, de manière très fidèle à la réalité

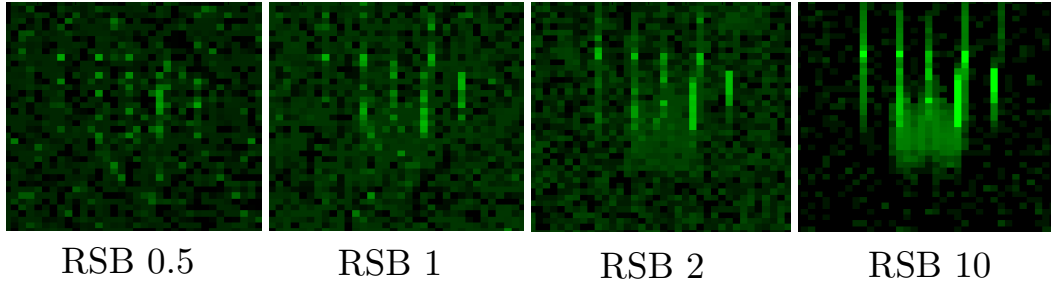


FIGURE 2.19: Comparaison des images simulées pour différents RSB.

des acquisitions, mais en en connaissant strictement les paramètres. C'est un avantage de taille à l'estimation des performances de nos algorithmes comme il le sera détaillé plus tard.

### 2.2.3 Enregistrement des données

L'enregistrement (*registration* en anglais) est une technique qui permet **la mise en correspondances de jeux de données** afin de pouvoir comparer ou combiner leurs informations respectives. Dans l'exemple plus spécifique de l'imagerie biologique, il s'agit de permettre de superposer les informations provenant d'échantillons différents et a fortiori de vésicules différentes. La technique permet alors de dégager des tendances qui ne sont observables que sur un grand nombre de vésicules superposées, que l'on ne saurait distinguer à partir d'analyses individuelles et indépendantes. Dans le cas de l'étude de la vésicule de Kupffer, l'enjeu de l'enregistrement se présente sous la forme de la question suivante : *comment mettre en forme les données afin de pouvoir comparer les informations provenant de vésicules de tailles, de formes et d'orientations différentes ?*

Dans la suite, nous décrivons le protocole utilisé à l'estimation des transformations à effectuer afin de combiner les informations issues de vésicules individuelles. Cette étape comporte alors trois parties indépendantes : l'enregistrement de l'orientation de la vésicule, celle de sa forme, puis l'enregistrement des cils individuels.

**Enregistrement de l'orientation de la vésicule** Pour comparer deux vésicules, la première étape est de considérer leurs orientations respectives. Bien que le montage de l'embryon pour l'imagerie suive un protocole rigoureux, visant à placer la vésicule au sommet de l'embryon dans une orientation comparable d'une acquisition sur l'autre, la vésicule n'est jamais strictement disposée de la même manière par rapport à l'objectif du microscope. Ainsi, les repères les plus pertinents sont les axes biologiques du poisson, dans lesquelles la vésicule se trouve toujours orientée de la même manière. Ce principe fait écho au rôle de la vésicule dans la différenciation de l'axe gauche-droite : elle se définit au travers de ce système de coordonnées. L'enregistrement des données pour l'orientation consiste alors à redéfinir toutes les coordonnées utiles de la vésicule dans le référentiel des axes biologiques du poisson. Celui-ci se compose de l'axe postérieur vers antérieur  $u_{PA}$ , droite vers gauche  $u_{RL}$  et ventral vers dorsal  $u_{VD}$ . Les axes biologiques du poisson sont déterminés au moyen de l'image grand champ de vue acquise précédemment. Celle-ci partage la même orientation absolue de la vésicule de Kupffer dans les axes du microscope que l'image haute résolution sur laquelle sera conduit le reste de l'analyse. Ainsi, il s'agit d'utiliser une première image où les axes sont facilement repérables dans le but de déterminer l'orientation de la vésicule dans le référentiel de l'image. Il suffira ensuite de porter cette information sur l'image haute résolution utile à l'analyse, afin de compenser l'orientation des données qui en sont extraites.



**Outil d'enregistrement de l'orientation : l'outil *Reference Frame* d'Imaris**

Placer les axes biologiques se fait à l'aide d'une visualisation de l'acquisition champ large par le logiciel Imaris. Il faut alors, à l'aide de points de référence dans la morphologie du poisson, placer les trois axes orthogonaux ( $u_{PA}, u_{RL}, u_{VD}$ ) dans l'espace. Imaris propose différents outils permettant de manipuler et d'interagir avec l'image en 3D ; jusqu'en 2015, aucun n'était adapté à l'enregistrement de données. La méthode utilisée pour le repérage des axes se faisait alors au moyen de l'outil *orthoslicer*, natif d'Imaris. Il s'agissait alors de placer manuellement des plans de coupe indépendants, orthogonalement les uns aux autres et suivant les axes biologiques du poisson. Bien que la technique fonctionne dans la pratique, celle-ci était jusqu'alors très longue et laborieuse : la procédure pouvait alors prendre jusqu'à plusieurs heures par vésicule. Pour répondre à ce problème, j'ai développé, au cours de six mois passés dans la société Bitplane, un outil interactif d'enregistrement spatial et temporel des données 4D (3D + temps) : l'outil *Reference Frame* d'Imaris. Celui-ci se présente sous la forme d'un repère orthonormé direct comprenant 6 degrés de liberté spatiale : sa position ( $x, y, z$ ) ainsi que son orientation, que l'on peut représenter par le quaternion  $q = (w, x, y, z)$  (qui représente une rotation à 3 degrés de libertés). Il est possible de définir ces 6 degrés de libertés dans le temps afin de permettre un enregistrement de données dynamique. L'outil *Reference Frame* facilite alors grandement la détermination des axes biologiques du poisson. Parmi les nombreuses fonctionnalités développées, il permet de :

- Manipuler de manière rigide les trois axes orthogonaux simultanément.
- Translater et orienter le repère de manière rapide et intuitive.
- Visualiser des plans de coupes orthogonaux aux trois axes du jeu de donnée.
- Orienter le *Reference Frame* dans un plan fixé par l'utilisateur et orthogonal à l'un de ses axe.

À partir de cet outil nous pouvons alors procéder à l'enregistrement des données sur l'image à champ de vue large. Les axes biologiques sont ainsi définis à l'aide de points de repère internes à l'embryon : les axes dorso-ventral et gauche-droite sont alors contenus dans le plan tangent à la surface de l'embryon quand l'axe antero-postérieur est marqué de manière visible par la ligne médiane du poisson. À partir de ces repères, la procédure classique est illustrée figure 2.20 et se conduit comme suit :

1. Activer les trois plans de coupe orthogonaux afin de visualiser le jeu de données.
2. Placer le *Reference Frame* au centre de la vésicule par translation.
3. Orienter itérativement le *Reference Frame* de telle sorte que le plan (xy) du repère soit tangent à la surface de l'embryon. Finalement l'axe Z du repère doit pointer dans la direction dorsale de l'embryon.
4. Fixer le plan (xy) orthogonal à l'axe Z du repère.
5. Orienter le *Reference Frame* dans le plan (xy), de telle sorte que l'axe X du repère pointe vers la ligne médiane de l'embryon. C'est une structure en forme de ligne, tapissée de cils marqués, indiquant la direction antérieure de l'embryon.

Ainsi, la procédure d'enregistrement de l'orientation de la vésicule peut se faire en ces quelques étapes clés, et en quelques secondes. Cette opération nécessite une connaissance de la morphologie du poisson et est difficilement automatisable. L'outil accélère cependant largement le traitement de cette partie de la chaîne, qui demeure limitante à l'ajout d'un nombre croissant de vésicules. Une fois le *Reference Frame* ainsi placé, ses valeurs de position et d'orientation sont extraites via l'interface de communication Imaris-Matlab. Seule l'orientation est alors récupérée sous la forme d'un quaternion  $q = (w, x, y, z)$  dans Matlab, la position de la vésicule dans l'image n'ayant pas d'intérêt pour la suite de l'analyse. À ce stade de la procédure d'enregistrement, nous possédons l'information de l'orientation de la vésicule dans l'espace sous la forme du quaternion  $q$ . Celui-ci nous permettra par la suite de compenser l'orientation spécifique de chaque vésicule.

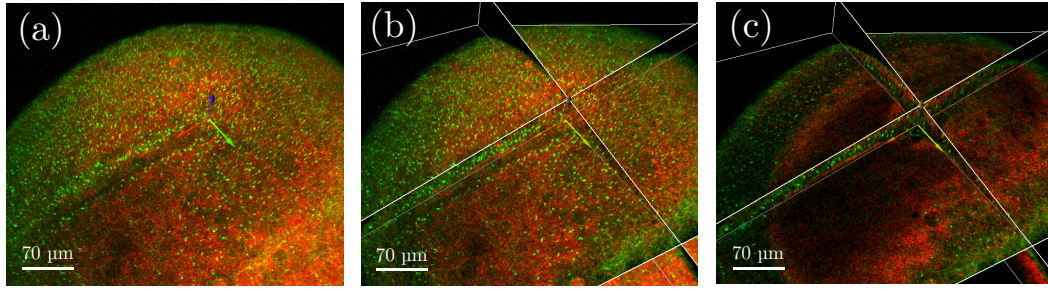


FIGURE 2.20: Utilisation du *Reference Frame* pour le repérage des axes biologiques. (a) Visualisation du volume. (b) Visualisation du volume et des plans de coupe associés au *Reference Frame*. (c) Visualisation à l'aide des plans de coupe uniquement.

**Enregistrement de la forme de la vésicule** L'orientation de la cavité dans les axes biologiques étant alors repérée, il n'est cependant toujours pas possible de superposer l'information issue de vésicules différentes. En effet, celles-ci sont toujours de tailles et de formes différentes d'un embryon à l'autre. Nous démontrons que la vésicule est de forme ellipsoïdale [27]. En première approximation, la cavité peut être en fait être assimilée à une sphère dont l'un des axes a été contracté. En mathématiques, on appelle cette forme une *ellipsoïde de révolution*, ou encore un *sphéroïde*. La forme est alors définie par deux paramètres :  $L_V$  la longueur de ses deux demi-axes égaux dans la direction X et Y, et la hauteur  $h_V$  du dernier demi-axe dans la direction Z. Bien qu'étant toutes ellipsoïdales, chaque vésicule est de forme différente. D'abord, parce qu'aucune n'est de forme parfaitement ellipsoïdale, ensuite parce que la longueur de leurs petits et grands axes diffère d'un embryon à l'autre. L'objectif est alors de parvenir à trouver un référentiel propre à chaque vésicule, tel que les informations qu'elle contient puisse être comparées indépendamment de la forme. En pratique, nous avons donc besoin d'estimer l'enveloppe de la vésicule. Pour l'extraire, nous utilisons la base de chaque cil présent à sa surface, que nous pointons manuellement. Non seulement cette information est utile à l'enregistrement de la forme de la vésicule, mais surtout à définir l'orientation relative des cils par rapport à sa surface, paramètre critique pour une étude hydrodynamique. Nous considérons dans cette partie l'image brute 3D haute résolution.

**Pointé manuel de la base des cils** Le premier paramètre à extraire à partir de l'image est la position de la base des cils. Cette information est utile pour deux raisons : d'abord, pour en extraire les informations de densité, de position, mais aussi l'enveloppe de la vésicule pour la suite de l'enregistrement de la forme. En effet, les cils étant répartis sur toute la surface interne de la vésicule, leur pointé permet de approximer sa géométrie dans l'espace.

L'étape d'extraction du paramètre de la base des cils est fastidieuse en 3D : lorsqu'elle est faite manuellement, elle requiert des outils de pointé performants dans l'espace ; lorsqu'elle est faite par traitement informatique, elle requiert un algorithme complexe à implémenter. Nous avons ici utilisé une méthode de **pointé manuel de la base de cils** qui tapissent l'intérieur de la cavité. Comme décrit précédemment et illustré figure 2.21, l'image obtenue comporte deux canaux : le cytoplasme dans le rouge (ici coloré numériquement en gris), les cils dans le vert (a). Le signal provenant du cytoplasme permet, à l'œil, de repérer les contours de la vésicule : sa surface externe est alors marquée, quand le liquide qu'elle contient ne l'est pas. Le logiciel Imaris nous permet alors de segmenter manuellement les contours de la vésicule afin de faciliter le pointé des bases (b). Les cils sont alors implantés à cette jonction, arborant pour la plupart l'artefact de balayage décrit plus haut. Il est alors visuellement assez évident de repérer la base d'un cil : elle constitue le sommet du cône, de plus forte intensité, et se trouve au voisinage de la surface de la vésicule. Le pointé se fait alors sur l'image haute

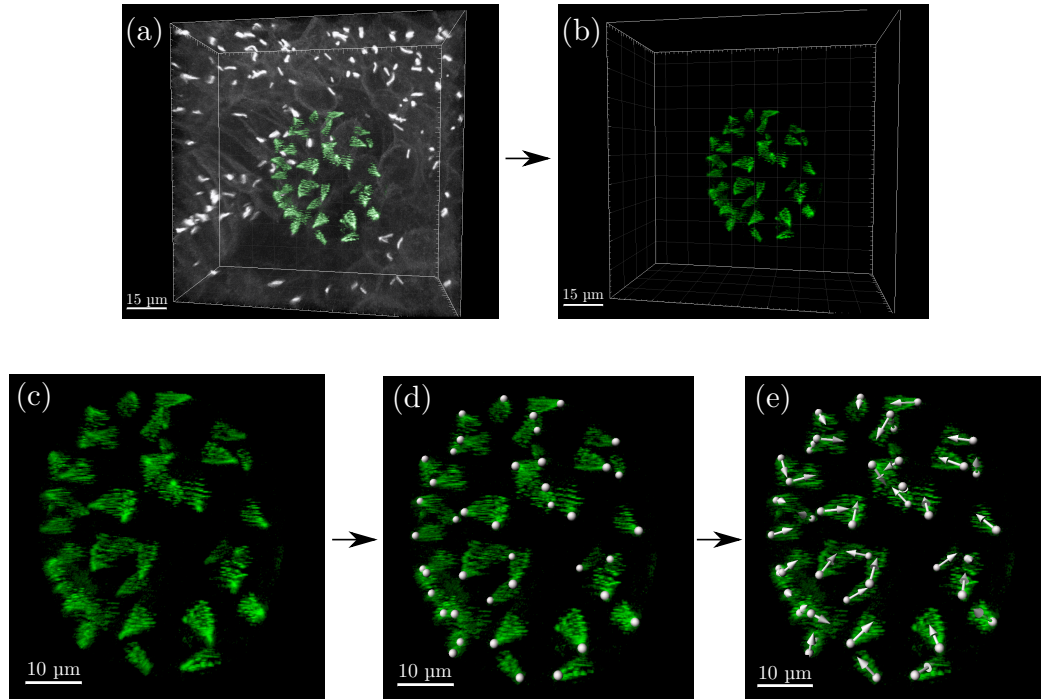


FIGURE 2.21: Étapes d'extraction des paramètres de position et d'orientation des cils. (a) Pour l'extraction de ces paramètres, nous utilisons l'image haute résolution à deux canaux. On trouve des cils à l'intérieur de la vésicule, mais pas seulement : on observe également des cils motiles ne contribuant pas à la dynamique de la vésicule, à l'extérieur de celle-ci. (b) Grâce au canal marquant le cytoplasme, il nous est possible de segmenter la vésicule pour ne conserver que les cils de sa surface. (c) La vésicule segmentée. (d) Le pointé manuel se fait à l'aide de l'outil **Spots** de Matlab et repère la base des cils, correspondant au sommet du cône de précession. (e) Les orientations sont détectées par un algorithme semi-automatisé : d'abord par une fonction Matlab appelée depuis Imaris XT, suivie d'une correction manuelle par l'utilisateur.

résolution de la vésicule, et au moyen de l'outil *Spots* natif d'Imaris qui permet de placer un point sur l'image en 3D (d). L'outil est optimisé pour repérer les zones d'intensité forte, ce qui facilite le placement manuel de la base des cils.

**Enregistrement de la forme à partir de la base des cils** La seconde étape à l'enregistrement de la forme de la vésicule consiste à visualiser les données extraites précédemment : dans Matlab, on peut afficher la position de la base dans l'espace. Il apparaît clairement que les axes de la cavité de forme ellipsoïdale ne sont pas orientés suivant les axes X, Y et Z du microscope, puisqu'elle n'a pas encore été corrigée pour l'orientation. Nous procédons donc d'abord à la correction de l'orientation de la vésicule, grâce à l'information de changement de référentiel contenue dans le quaternion  $q$ , estimé à l'étape précédente. Il suffit alors, pour chaque cil  $i$  de position  $P_i$  (dans le référentiel du microscope), d'appliquer le quaternion  $q^*$  correspondant à la transformation inverse de la rotation  $q$  définie par les axes biologiques du poisson. Nous appliquons cette même transformation  $q^*$  aux orientations  $\mu_i$  des cils dans le référentiel du microscope, afin de les convertir dans ce nouveau référentiel. En résulte une vésicule, composée de la position de la base des cils, orientées suivant les axes biologiques du poisson ((a) de la figure 2.22).

**Enregistrement de l'ellipsoïde** Pour permettre la combinaison des données, il est d'abord nécessaire de projeter les bases des cils sur une ellipsoïde : la procédure est décrite figure 2.22. Pour ce faire, à partir de positions des cils (a), il faut estimer la forme de

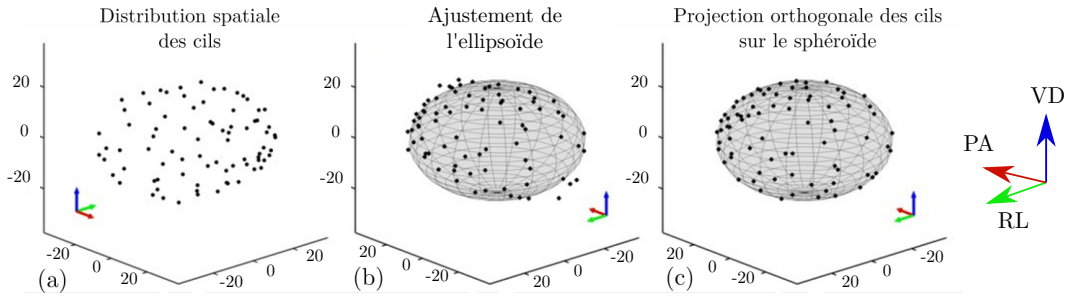


FIGURE 2.22: Enregistrement des positions de la base des cils grâce à l'ajustement d'une ellipsoïde de révolution. (a) révèle la forme générale de la cavité révélée par la répartition tridimensionnelle de la base des cils. (b) expose l'ajustement d'un sphéroïde (ou ellipsoïde de révolution), qui minimise la distance aux bases des cils. (c) correspond à la projection orthogonale des bases sur l'ellipsoïde précédemment définie. Axes en micromètres.

l'ellipsoïde qui correspond le mieux à la celle de la vésicule réelle. Nous ajustons alors une ellipsoïde alignée sur les axes biologiques du poisson, de grand demi-axe  $L_V$ , de petit demi-axe  $h_V$  (b). Ces paramètres sont estimés tels que la surface obtenue est celle qui minimise la distance quadratique moyenne aux bases des cils orientés dans le repère des axes biologiques. La fonction d'ajustement permet alors la définition d'une ellipsoïde par deux paramètres  $L_V$ ,  $h_V$ .

Puis, les positions des cils sont projetées orthogonalement à la surface définie (c). La faible distance entre les points et l'ellipsoïde atteste du bon ajustement de cette forme sur l'ensemble des vésicules [27]. Ainsi, on régularise la surface de la cavité pour en faire une ellipsoïde parfait sur laquelle sont réparties les bases des cils. La forme relative de la vésicule a alors été enregistrée : il ne reste que le dimensionnement des axes  $L_V$  et  $h_V$  à standardiser.

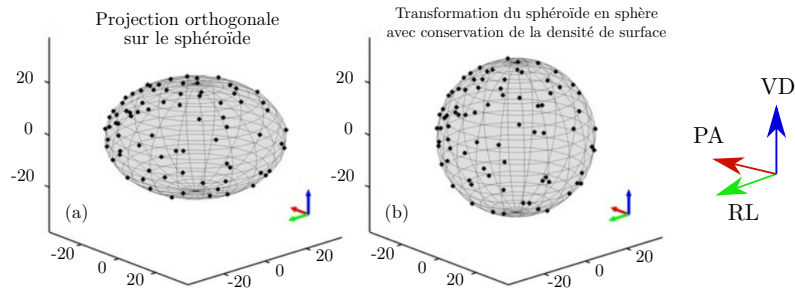


FIGURE 2.23: Transformation de l'ellipsoïde vers une sphère unité. (a) correspond à ellipsoïde ajustée, dont les demi-axes sont spécifiques à chaque vésicule. (b) permet l'uniformisation des dimensions de la cavité selon ces axes ; la transformation ici appliquée permet la conservation de la densité de surface des cils. Axes en micromètres.

**Sphérisation** À partir de cette forme ellipsoïdale, il est possible de *sphériser* la vésicule, pour deux raisons. D'abord, cela permettra de calculer une carte de densité des implantations des cils à la surface de la vésicule. Ensuite, cette représentation facilite la visualisation des données (projection 2D angulaire notamment). Les autres paramètres, d'orientation notamment, ont déjà été extraits et ne nécessitent pas cette transformation.

Il est ici crucial de ne pas compromettre l'information de densité de cils par cette transformation. Nous avons donc, avec la collaboration d'Andrej Vilfan (J. Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia), créé une fonction de sphérisation des données projetées sur l'ellipsoïde permettant

de conserver la densité de cils à sa surface : elle est illustrée figure 2.23. En effet, appliquer une transformation naïve d'homothétie suivant les axes biologiques du poisson aurait pour effet de densifier fortement les régions centrales suivant cette dimension, pour n'avoir que peu d'influence sur leurs extrémités. Pour la suite, en particulier pour l'analyse de la densité de cils à la surface au travers des vésicules, il est fondamental de conserver cette information au moyen d'une transformation prenant en compte les spécificités de la nature ellipsoïdale de la vésicule : cela requiert alors de travailler en coordonnées sphériques sur les positions de la base des cils. Ainsi, pour chaque cil de coordonnées cartésiennes dans la base des axes biologiques  $(x, y, z)_{\text{ellipsoïde}}$ , sur l'ellipsoïde de demi-axes  $L_V$  et  $h_V$  et donc d'excentricité  $e = \sqrt{\frac{L_V^2}{h_V^2} - 1}$ , nous définissons les coordonnées de l'azimut  $az$  et du rayon  $R$  telles que :

$$\begin{cases} az = \arctan\left(\frac{x}{y}\right) \\ R = \sqrt{\frac{L_V h_V}{2} \left( \frac{L_V}{h_V} + \frac{\operatorname{arcsinh} e}{e} \right)} \end{cases} \quad (2.3)$$

À partir de ces informations, il est possible de calculer les nouvelles coordonnées des bases des cils sur la sphère  $(x', y', z')_{\text{Sphère}}$  :

$$x' = R \times \frac{\frac{z}{c} \times \sqrt{1 + \frac{e^2 z^2}{c^2}} + \frac{\operatorname{arcsinh}(\frac{ez}{c})}{e}}{\sqrt{1 + e^2 + \frac{\operatorname{arcsinh} e}{e}}} \quad (2.4)$$

$$y' = R \times \sin\left(\frac{\arccos\left(\frac{z}{c} \sqrt{1 + \frac{e^2 z^2}{c^2}} + \frac{\operatorname{arcsinh}(\frac{ez}{c})}{e}\right)}{\sqrt{1 + e^2 + \frac{\operatorname{arcsinh} e}{e}}}\right) \times \cos az \quad (2.5)$$

$$z' = R \times \sin\left(\frac{\arccos\left(\frac{z}{c} \sqrt{1 + \frac{e^2 z^2}{c^2}} + \frac{\operatorname{arcsinh}(\frac{ez}{c})}{e}\right)}{\sqrt{1 + e^2 + \frac{\operatorname{arcsinh} e}{e}}}\right) \times \sin az \quad (2.6)$$

On définit ainsi les positions des cils sur une sphère de rayon  $R$ , que l'on peut ensuite uniformiser en sphère unité (b). Par cette transformation, on conserve la densité angulaire de répartition des cils. Il est alors possible de comparer des vésicules provenant d'embryons différents et d'établir une cartographie de la densité type au sein de la cavité (développé au 2.2.4).

**Enregistrement des cils individuels** Pouvoir comparer les vésicules entre elles est important, mais ne permet pas la comparaison de cils individuels. En effet, l'orientation du cil dans les axes biologiques du poisson n'a que peu de pertinence dans la génération du flux. Seule l'orientation du cil dans une base locale, relativement à la surface de la vésicule, définit ses propriétés hydrodynamiques (figure 2.8). Pour ce faire, nous utilisons la représentation de la vésicule ajustée par l'ellipsoïde, et pour laquelle les bases des cils ont été projetées orthogonalement. Grâce à celle-ci, on s'assure de conserver les orientations. Nous définissons alors, **pour chaque cil**, une base orthogonale locale  $B_i = (e_f, e_n, e_m)_i$  biologiquement pertinente à l'échelle du cil, illustrée au (a) de la figure 2.24. À partir de la base pointée du cil, on définit les trois vecteurs comme suit :

- $e_n$  est le vecteur normal à la surface de la cavité, pointant vers son centre.
- $e_f$  est le vecteur orienté le long de la surface et orthogonal à l'axe dorso-ventral de la vésicule : il définit les lignes parallèles de l'ellipsoïde (horizontales) et est orienté dans le même sens que le flux de rotation généré à l'intérieur de la cavité.
- $e_m$  est le vecteur orienté le long du méridien de l'ellipsoïde, allant du pôle ventral au pôle dorsal de la vésicule.

À ce niveau de la chaîne de traitement, il nous est possible de superposer les vésicules individuelles, mais surtout chaque cil de chaque vésicule, grâce à la procédure d'enregistrement

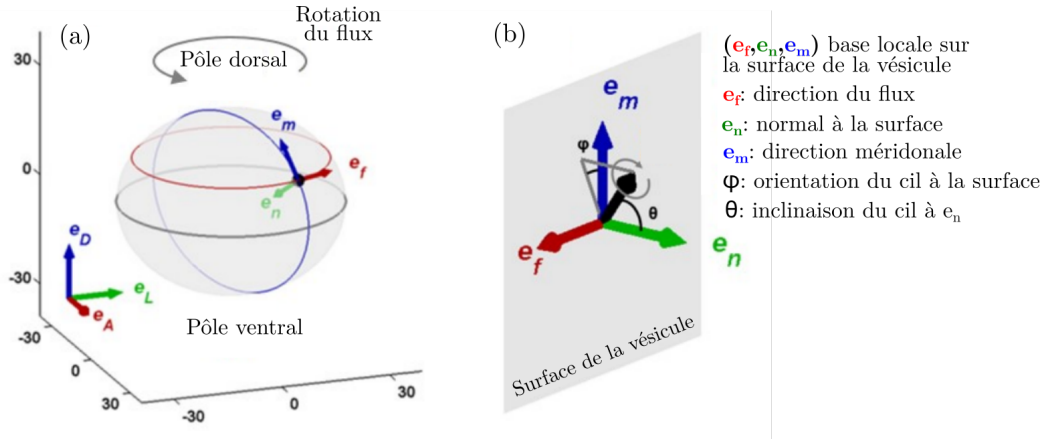


FIGURE 2.24: Illustration de la définition de la base locale de chaque cil. (a) expose la définition de cette base à l'échelle de la vésicule, et en fonction de ses caractéristiques propres (flux, normale, méridien). (b) décrit le paramétrage de cette base et du vecteur  $\mu$  spécifique à chaque cil.

des données. Il nous reste toutefois alors à en extraire les paramètres biologiques, que nous pouvons à présent comparer. La procédure d'enregistrement nous permet alors de comparer des paramètres provenant de différents cils au sein d'une cavité, mais aussi des cils provenant de vésicules différentes. Elle permet également d'extraire certains paramètres à l'échelle de vésicules entières (répartition de densité notamment), indépendamment de leur orientation, forme ou taille.

**Pertinence des paramètres extraits, rigueur des transformations** Depuis le pointé des positions et des orientations des cils jusqu'à la représentation sur une sphère, nous avons conduit au cours de cette section un nombre conséquent de transformations. Dans ce paragraphe, nous justifierons que ces transformations n'induisent pas de biais dans le traitement des données, et nous tenterons d'apporter un regard critique sur la pertinence biologique des paramètres ici extraits.

D'abord, l'identification des bases des cils est manuelle et donc sujette à l'erreur de pointage de l'utilisateur. C'est aussi vrai, à moindre mesure, pour la détection semi-automatisée des orientations associées. Le repérage des axes biologiques au moyen de l'outil *Reference Frame* constitue la première approximation de notre protocole. Nous utilisons ainsi les axes du poisson pour estimer l'orientation de la vésicule. En pratique, l'ajustement de l'ellipsoïde et la projection des bases sur elle se révèle pertinente, comme en témoignent les faibles résidus associés (suppléments [27]) et permettent de valider empiriquement la méthode.

Les bases locales définies par la suite permettent de comparer l'orientation des cils. Cette représentation est pertinente du point de vue hydrodynamique, et rend l'orientation du cil indépendante de sa position sur l'ellipsoïde. Toutefois, l'ajustement par une ellipsoïde tend à lisser la surface interne de la vésicule : la base locale ainsi définie ne tient pas compte des irrégularités internes de la cavité, et constitue donc une seconde approximation de la chaîne. Enfin, la procédure de sphérisation est une transformation qui est respectueuse des densités locales. Cette représentation permet alors de visualiser la cavité de manière plus intuitive, en particulier via des cartes 2D angulaires. Grâce à elle, il est également possible de procéder à un calcul de densité locale, comme il le sera détaillé dans la section 2.2.1. Après sphérisation, les angles définis dans la base locale sont inchangés : ces dernières sont en effet identiques dans la géométrie ellipsoïdale et sphérique.

Au bilan, la mise en correspondance des données telle que conduite ici souffre de lé-

gères erreurs d'estimation, mais d'aucun biais intrinsèque induit par les transformations. Elles permettent alors l'extraction des données tout en assurant la pertinence biologique des paramètres collectés.

#### 2.2.4 Extraction des paramètres biophysiques des cils

Les étapes précédentes peuvent être assimilées à un travail préparatoire en vue de l'extraction de paramètres. Cette partie vise à extraire les informations quantitatives caractéristiques de la vésicule et indispensables à la compréhension de ses enjeux biologiques. À partir d'une image haute-résolution de la vésicule composée d'un ensemble de voxels d'intensités différentes, on cherche à dégager des paramètres pouvant permettre de décrire la biophysique de la cavité. Parmi ceux-ci, nous souhaitons extraire les informations suivantes : la motilité du cil, leur position, leur orientation, leur ouverture ou encore leur longueur, au sein de la vésicule.

**Classification du type de cils** Au sein de la vésicule, il existe deux types de cils dont la fonction interne à la cavité reste encore discutée. D'abord, les cils motiles, majoritaires et reconnaissables à leur artefact de balayage de forme conique, sont ceux responsables de la génération du flux directionnel de la vésicule. Par ailleurs, on trouve également quelques cils immotiles dont on ignore la fonction. La proportion de chacun de ces deux types ainsi que les tendances respectives dans leur orientation, distribution et nombre au cours du temps, sont autant de paramètres qu'il nous est intéressant d'estimer quantitativement. Nous avons classé chaque cil manuellement dans l'une des quatre catégories suivantes :

- Cils motiles dont l'orientation est claire à l'image.
- Cils immotiles dont l'orientation est claire à l'image.
- Cils immotiles dont l'orientation est difficile à déterminer à l'image.
- Cils dont le type et l'orientation sont difficiles à déterminer à l'image.

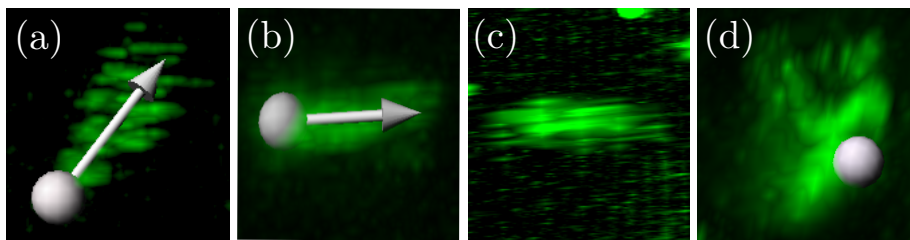


FIGURE 2.25: Classification des types de cils sous Imaris. (a) Cil motile à l'orientation définie. (b) Cil immotile à l'orientation définie. (c) Cil immotile dont l'orientation est difficile à déterminer (sens, axe). (d) Cil dont la motilité et l'orientation sont difficiles à déterminer.

La classification se fait alors au sein même d'Imaris par la création de quatre dossiers dans lesquels sont répartis les *Spots* associés au pointage des bases de chaque cil. La figure 2.25 illustre les 4 types typiques de cils que l'on trouve dans ces jeux de données.

**Détermination semi-automatisée de l'orientation des cils** Le deuxième paramètre important est l'orientation des cils dans la vésicule : c'est une information primordiale à la compréhension de la génération du flux. La méthode ici utilisée est semi-automatisée, c'est-à-dire qu'elle requiert généralement une correction a posteriori de l'orientation déterminée automatiquement. Cette fonction développée sous Matlab est appelée via l'interface Imaris XT. Elle permet à partir des positions des bases des cils et de la distribution des intensités au voisinage de ce dernier, de repérer l'axe principal autour duquel le cil effectue son mouvement

de précession : c'est-à-dire la transition entre l'image (d) et (e) de la figure 2.21. Nous considérerons dans la suite que l'orientation du cil correspond à la médiane du cône de l'artefact de balayage.

**Fonction automatisée pour estimer l'orientation** La fonction automatisée utilise l'interface d'appel de fonctions Matlab via Imaris : Imaris XT. La fonction de détermination des orientations a donc été implémentée sous Matlab, mais directement appelée via un menu intégré à Imaris. La fonction procède comme illustré figure 2.26 : après avoir choisi l'un des 4 dossiers définis précédemment, elle traite séquentiellement chaque *Spot* correspondant à la base repérée d'un unique cil. Pour chacun d'entre eux, elle projette sphériquement les intensités au voisinage de la base du cil, sur une distance choisie par l'utilisateur. Celle-ci doit être suffisamment grande pour éviter de ne considérer que le signal isotrope de la base du cil mais suffisamment petite pour ne pas collecter du signal des cils adjacents. Nous verrons par ailleurs que c'est l'un des principaux problèmes à l'estimation de l'axe. La valeur typique est de l'ordre de 5  $\mu\text{m}$ , ce qui correspond à la longueur moyenne d'un cil. Le signal ainsi projeté, on observe que l'artefact de balayage se visualise aussi très bien sur la sphère (b). Bien que l'orientation privilégiée soit visuellement repérable, on note que le signal est assez hétérogène dans la zone du cil : il se présente sous la forme d'une succession de zones de fortes et faibles intensités qu'il peut être difficile d'analyser numériquement. Pour pallier ce problème, nous appliquons un moyennage local en vue de lisser le signal en surface de la sphère (c). Nous appliquons en sus une correction gamma  $\gamma$  telles que les intensités résultantes  $I_\gamma = I^\gamma$ . Ce paramètre permet d'atténuer les intensités plus faibles en même temps que de révéler les zones plus intenses, caractéristiques du cône du cil. En résulte une tache homogène dont le centre indique nettement l'orientation privilégiée du cil.

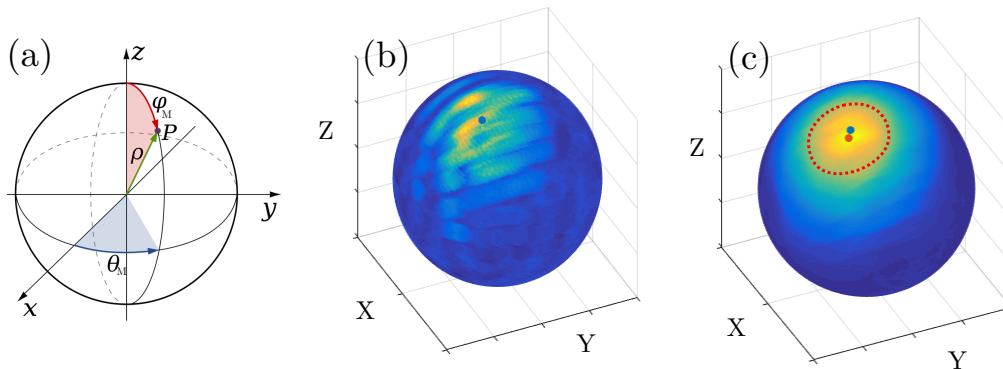


FIGURE 2.26: Principe de la détection de l'axe de précession des cils. (a) On utilise les coordonnées sphériques  $(\theta_M, \phi_M)$  pour l'orientation du cil dans la demi-sphère, dans le repère du microscope  $(X, Y, Z)$ . (b) Le signal est projeté sur une sphère. Le point bleu représente l'orientation simulée du cil : l'artefact de balayage apparaît clairement sur cette représentation, qui nécessite un traitement pour améliorer l'ajustement de la fonction. (c) Lissage du signal, puis ajustement par une fonction de Von-Mises sur la sphère. Le point rouge symbolise l'orientation détectée par l'algorithme.

Nous procédons à un ajustement sur la sphère de la tache ainsi obtenue. Pour ce faire, nous considérons la **distribution de Von-Mises Fischer** [45], équivalente de la distribution normale sur la sphère. Cette distribution dépend de trois paramètres : deux définissent  $\mu$  définie comme l'orientation moyenne de la distribution sur la sphère, et  $\kappa$  le facteur de concentration témoignant de la dispersion de celle-ci. La distribution de Von-Mises Fischer est isotrope ; son pendant anisotrope, la **distribution de Kent** permet de considérer des disparités de dispersions dans des directions orthogonales. Empiriquement, nous n'observons pas de différences dans les résultats et choisirons d'utiliser la fonction de Von-Mises Fischer,



plus simple à implémenter et à faire converger.

**Ajustement manuel** Les résultats de l'ajustement sont convaincants dans le cas où le cil considéré est isolé. En revanche, lorsque leur densité est plus forte dans certaines régions de la vésicule, la détection est la plupart du temps erronée et doit être corrigée manuellement. Selon les vésicules et la qualité de l'imagerie (RSB, résolution), il peut être nécessaire de corriger entre 20 et 80% des orientations, au moins dans la direction Z du référentiel du microscope, où la résolution est moins bonne qu'en X et Y. En pratique, la correction manuelle est longue et fastidieuse : il faut ajuster numériquement les valeurs du vecteur dans Imaris. Aucun outil de correction intuitif en 3D n'existe dans le logiciel. Le temps nécessaire à la correction manuelle rend cette étape limitante à l'ajout de nouvelles vésicules. Nous établirons dans la suite, section 2.3.2, les stratégies possibles d'amélioration de cette partie de la chaîne de traitement.

**Calcul des angles  $\phi$  et  $\theta$**  La représentation vectorielle  $\mu_B = (\mu_X, \mu_Y, \mu_Z)_B$  (repère local) n'est pas optimale pour la comparaison des cils entre eux. Nous définissons alors, à partir de ces composantes vectorielles de la base locale, deux angles définissant complètement l'orientation tridimensionnelle du cil :

- $\theta$ , correspondant à l'angle d'inclinaison des cils par rapport à la normale de surface.
- $\phi$ , correspondant à l'orientation de la projection des cils sur la surface de la cavité.

Ces deux paramètres expriment en réalité l'orientation du vecteur  $\mu_B$  dans le système de coordonnées sphériques ((b) de la figure 2.24).  $\theta$  et  $\phi$  sont alors des caractéristiques ciliaires critiques, puisque hydrodynamiquement pertinentes. Ces deux paramètres ont une contribution forte sur l'amplitude et la direction du flux généré dans la vésicule : l'inclinaison  $\theta$  conditionne l'asymétrie spatiale, permettant au cil motile de générer un flux directionnel à faible nombre de Reynolds. L'amplitude du flux est proportionnelle à  $\sin(\theta)$ . Une inclinaison nulle de  $\theta$  se traduit par l'absence de flux directionnel. Dans le cas d'une inclinaison  $\theta$  non nulle, l'angle  $\phi$  déterminera l'orientation du flux généré par le cil.  $\phi$  peut également moduler l'amplitude du flux : par exemple, si deux cils ont la même inclinaison  $\theta$  mais des angles  $\phi$  opposés, les flux générés par chaque cil s'annulent, résultant en un flux net nul.

**Exactitude, précision de la détection** La détection automatique de l'orientation présente, visuellement, des résultats satisfaisants lorsqu'elle s'applique à l'extraction de l'axe d'un cil isolé. Cependant, la quantification visuelle par l'utilisateur de la détermination de l'axe par artefact de balayage peut s'avérer limitée : *comment s'assurer que la détection automatique, et a fortiori la correction manuelle, permettent d'estimer avec exactitude et précision l'orientation réelle du cil ?*

Pour étalonner les performances de la détection et sa réponse aux changements de paramètres (RSB, angle, résolution), nous utilisons les simulations décrites plus tôt, afin de générer un grand nombre de cils aléatoires dont on connaît les paramètres. Ainsi, la méthode nous permet de comparer les grandeurs estimées avec celles qui ont été utilisées pour la création de l'image artefactuelle. Cette méthode implique la validité du modèle de génération des images, et la simulation comme étant représentative de la réalité biologique. D'abord, il s'agit de tester la détection de l'orientation pour la génération d'un cil aléatoire, selon une gamme de valeurs disponibles pour chaque paramètre. La figure 2.27 expose les résultats obtenus sur un jeu de données de 5000 cils aléatoires générés par simulation, puis détectés par l'algorithme. La métrique utilisée est l'angle entre le vecteur utilisé pour la génération de l'image et celui extrait de l'image. Ces 5000 cils ont été générés avec un axe de direction aléatoire sur

une demi-sphère, pour une résolution XY comprise entre 0.5 et 1.4  $\mu\text{m}$ , une résolution en Z comprise entre 1.5 et 6  $\mu\text{m}$ , et une valeur de RSB entre 0.3 et 10.

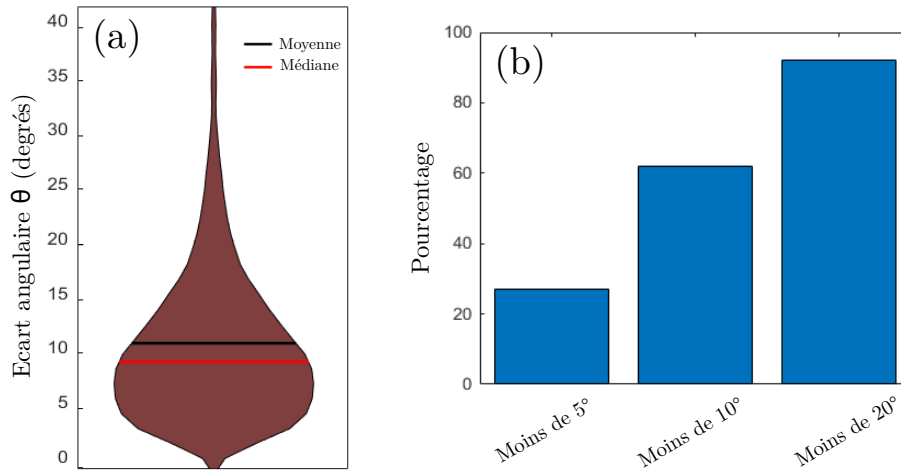


FIGURE 2.27: Performance de la détection de l'orientation à partir d'un jeu de 5000 cils simulés. (a) Diagramme en violon de la distribution de l'angle  $\theta$  entre le vecteur utilisé pour la génération  $\mu_{Gen}$  et le vecteur détecté  $\mu_{Det}$ . (b) Diagramme à barres de la proportion des détections dont l'angle est sous un seuil donné. Plus de 90% des orientations sont détectées avec moins de 20° d'erreur.

Des résultats généraux, nous constatons que les résultats sont satisfaisants dans le cas où le cil est isolé : plus de 90% des orientations sont détectées à moins de 20° de l'orientation réelle ; plus de 60% le sont à moins de 10°. On remarque cependant que pour quelques cils, l'algorithme mésestime assez largement l'axe d'orientation : il est alors intéressant d'en identifier les causes. Pour ce faire, nous étudions alors la précision et l'exactitude de la détection en fonction de quatre paramètres, pouvant largement détériorer la qualité de celle-ci : le RSB, la résolution en XY, en Z, et l'angle à l'axe Z (référentiel du microscope). Les résultats apparaissent à la figure 2.28, qui décrit l'influence de chaque paramètre sur la qualité de la détection. D'après les diagrammes en boîtes présentés, on observe que la résolution n'a que peu d'influence, et ce quelle que soit la direction, en XY ou en Z (a)(b). Il est à noter que dans ce cas, la métrique utilisée est l'écart angulaire entre les vecteurs, nécessairement positive : même exacte, la médiane est supérieure à zéro.

De plus, et comme on pouvait s'y attendre le RSB a une influence directe sur l'angle  $\theta$  entre les vecteurs générés et détectés (c) : pour les RSB inférieurs à 1, on observe une plus grande variabilité des résultats (précision) ainsi qu'une valeur médiane plus élevée (exactitude). En revanche, la détection semble ne pas être facilitée par un RSB sensiblement supérieur à 1. Par ailleurs et plus étonnamment, on observe une forte différence de l'exactitude de détection en fonction de l'angle à l'axe Z. Cela s'explique notamment par l'anisotropie de résolution qui se fait plus évidente lorsque l'on s'écarte de l'axe Z.

À la vue des résultats de cette analyse, il paraît difficile d'améliorer l'algorithme déjà existant : celui-ci souffre de limitations qui sont propres à l'image et il n'apparaît pas d'axe clair d'optimisation de ses performances. Cependant, d'autres méthodes se basant sur un paradigme différent peuvent être envisagées : l'*apprentissage automatique* ne requérant pas de définition explicite du problème, semble être une piste intéressante à explorer afin de rendre cette étape de détection plus efficace. Cette perspective sera développée dans la suite, à la section 2.3.2.

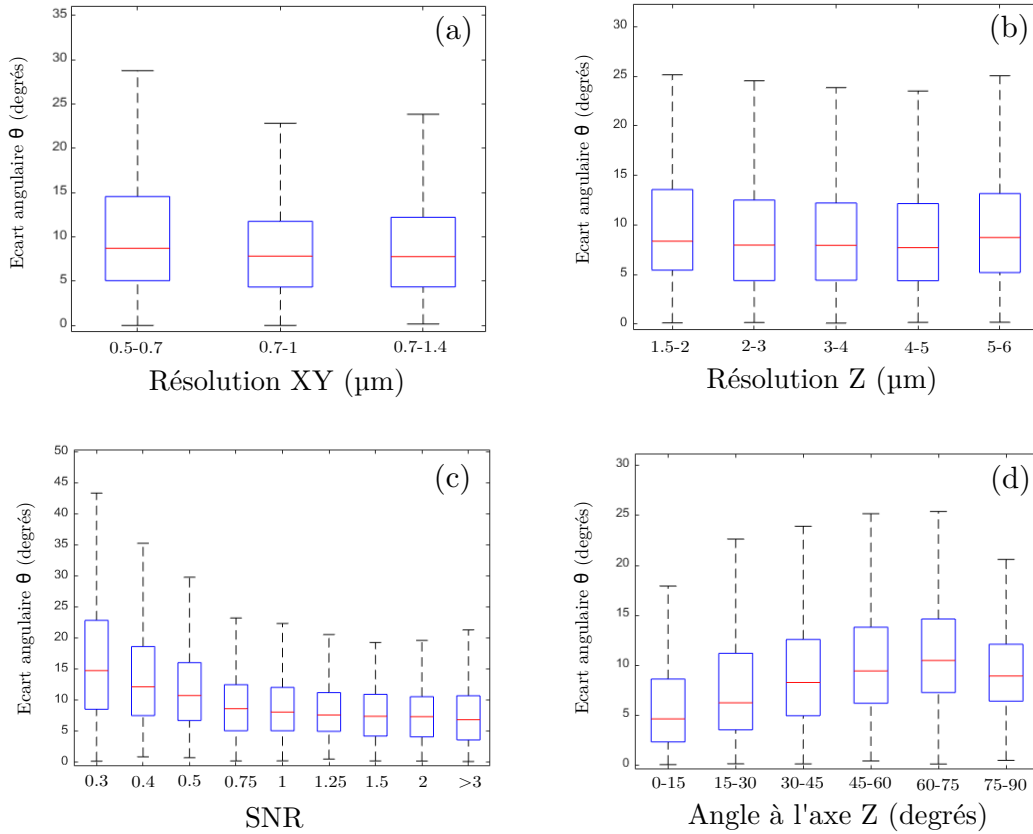


FIGURE 2.28: Influence des paramètres sur la détection de l'orientation. (a) Influence de la résolution en XY. (b) Influence de la résolution en Z. (c) Influence du RSB. (d) Influence de l'orientation selon l'axe Z de l'axe généré du cil.

**Mesure du cône : longueur et ouverture des cils** Grâce aux images que nous avons acquises, et en particulier aux artefacts de balayage, il nous est alors possible d'extraire deux paramètres supplémentaires : la longueur des cils, et l'angle d'ouverture du cône de précession. Ces deux paramètres ont une influence directe sur l'intensité du flux généré par chaque cil, bien qu'ils ne conditionnent pas son orientation. Ici encore, la détection de ces deux paramètres se fera de manière semi-automatisée : une première estimation donnée par un algorithme, peut-être corrigée ou non par l'utilisateur, a posteriori. Cela assure alors l'exactitude de la mesure tout en réduisant le temps de traitement. Cette étape nécessite l'utilisation, pour chaque cil, des informations de position de la base  $P_i = (x_i, y_i, z_i)$  ainsi que son orientation  $\mu_i$ . Cette étape survient séquentiellement après la détection des deux paramètres précédents. À partir de ces données, la détection de la longueur et de l'ouverture du cône dépend de la même mesure, décrite ci-dessous.

**Mise en forme des données** Comme il l'a été détaillé précédemment, travailler directement sur l'image 3D peut s'avérer fastidieux. En l'absence d'outils dédiés il est souvent difficile de réaliser des tâches de pointage rapide et précis dans l'espace. De la même manière, une segmentation automatisée 3D peut s'avérer coûteuse et complexe à formaliser. Ainsi, la première étape de l'extraction de la longueur et l'ouverture des cils consiste à mettre en forme les données en 2D. Il s'agit alors de projeter l'information de l'enveloppe du cil sur un plan de coupe sur lequel nous estimerons les paramètres de longueur et d'ouverture du cône. Pour ce faire, nous procédons comme suit :

1. Extraire, à partir de la position de la base du cil  $P_i$ , une sous-matrice de dimension  $12 \times 12 \times 12 \mu\text{m}$  (pour contenir un cil de longueur environ  $5 \mu\text{m}$  dans toutes les directions).

L'échantillonnage de l'image étant anisotrope ( $\delta x = \delta y = 0,2 \mu\text{m}$  et  $\delta z = 0,8 \mu\text{m}$ ), cela correspond à une matrice de dimension environ  $(n_X, n_Y, n_Z) = 60 \times 60 \times 15$  voxels, dont le centre correspond à la base du cil.

2. Rendre l'image extraite isotrope, afin d'éviter tout problème de calcul de distance sur une image de résolution anisotrope. Pour ce faire, on étend la matrice par interpolation dans la direction Z, de telle sorte à ce que  $n_{X,Y} = n_Z = 60$  dans notre exemple.
3. Calculer l'équation du plan contenant le vecteur d'orientation  $\mu$ , et un vecteur à la fois orthogonal à  $\mu$  et à la direction Z de l'acquisition et passant par la base du cil  $P_i$ . Ainsi, on obtient un plan de coupe suivant l'orientation du cil, en limitant la contribution basse résolution de l'image en Z ((b) et (c) figure 2.16).
4. Projeter les voxels qui sont à une distance  $d < d_{\text{proj}}$  orthogonalement au plan de coupe. La distance  $d_{\text{proj}}$  peut être modifiée par l'utilisateur : plus elle est grande, plus l'enveloppe du cil se dessine sur le plan de coupe. En revanche, une distance trop importante peut afficher les cils adjacents sur le plan de coupe, détériorant ainsi la détection.

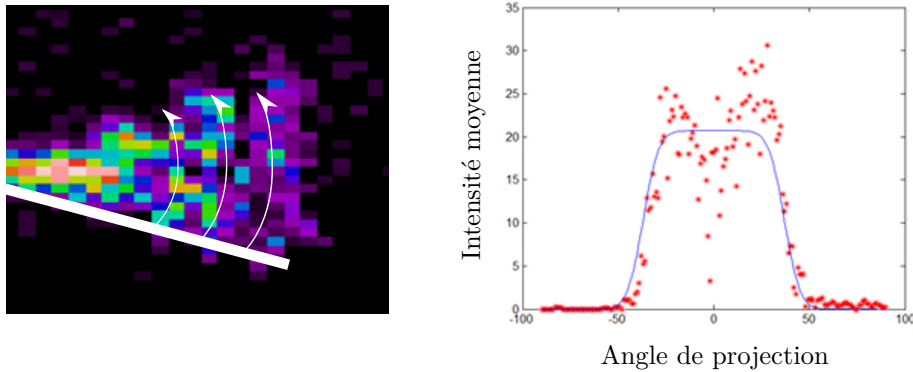


FIGURE 2.29: Principe de la mesure d'ouverture du cône d'un cil. Une fois projeté sur un plan 2D, on moyenne à un angle donné (ici en degré) les pixels le long du cil pour en estimer la valeur associée. À partir des points collectés, on peut ajuster une courbe permettant d'estimer l'ouverture. Le procédé est analogue pour la longueur.

**Détection de la longueur et de l'ouverture** À ce niveau du traitement, nous avons à notre disposition une image 2D présentant l'enveloppe d'un cil projeté, mais non déformé (image isotrope). Sur cette projection, le cône caractéristique de l'enveloppe du mouvement du cil apparaît clairement, orthogonalement au bord droit de l'image. La base du cil se trouve au centre du bord droit. Il reste alors à en extraire la longueur et l'ouverture, au moyen de projections et d'un ajustement de courbe en 1D. La procédure est illustrée 2.29. Les deux mesures sont alors indépendantes ; une estimation de la longueur est obtenue comme suivant :

1. Projeter angulairement (à rayon constant) radialement les intensités de l'image, dont la base du cil est le centre du cercle. On obtient alors une courbe 1D de l'intensité moyenne des pixels en fonction de la distance à la base du cil.
2. Tronquer la courbe, afin de ne pas considérer la contribution du micron avoisinant la base du cil. Cette zone étant d'une intensité très forte de par la présence permanente d'une partie du cil à cet endroit, elle risque de perturber l'ajustement de la courbe.
3. Dupliquer, retourner, et concaténer la courbe avec son symétrique, afin d'en permettre l'ajustement d'une fonction porte.
4. Ajuster la courbe obtenue par une fonction porte. Celle-ci est définie par l'inverse d'une fonction cosinus hyperbolique. Pour en accentuer la dynamique, on portera l'argument

de la fonction hyperbolique à la puissance 4. On obtient alors la fonction suivante, dépendante des paramètres  $k_1$  et  $k_2$  :  $f(x) = \frac{k_1}{\cosh(\frac{x^4}{k_2})}$

5. Déterminer le paramètre  $L_{\text{fit}}$  associé à la largeur à 10% de la hauteur de la porte. Cette valeur de 10% est une valeur déterminée empiriquement et qui permet d'être au plus près des résultats qui auraient été obtenus par estimation manuelle.
6. Déduire la valeur de la longueur  $L$  à partir de la courbe symétrisée et tronquée.  $L = \frac{(L_{\text{fit}}+2)}{2} \mu\text{m}$

Puis, on procède à l'estimation de l'ouverture par méthode similaire :

1. Projeter radialement (à angle constant) les intensités de l'image, dont la base du cil est le centre du cercle. On obtient alors une courbe 1D de l'intensité moyenne des pixels en fonction de l'angle par rapport au vecteur  $\mu$ . Le faire sur
2. Ajuster la courbe obtenue par une fonction porte. Ici encore, la fonction utilisée est  $f(x) = \frac{k_1}{\cosh(\frac{x^4}{k_2})}$
3. Estimer l'ouverture  $\theta$ , correspondant à la largeur à 90% de la hauteur de la porte. Cette valeur de 90% est une valeur déterminée empiriquement et qui permet d'être au plus près des résultats qui auraient été obtenus par estimation manuelle.

De la sorte, nous avons estimé sur l'image 2D la valeur de longueur et d'ouverture du cône du cil considéré. Cependant et comme il l'a été évoqué précédemment, il arrive régulièrement que la détection ainsi décrite ne fonctionne pas correctement, pour plusieurs raisons. La première peut être l'inhomogénéité du signal sur le cône, ce qui rend l'ajustement inefficace. Le second, concerne la présence d'une forte densité de cils qui viennent perturber l'image extraite et donc la détection. Pour s'assurer d'une estimation correcte sur l'intégralité des cils, nous avons développé une interface utilisateur de correction du cône détecté. Celle-ci permet de visualiser l'enveloppe du cône et d'en repérer la forme à l'aide d'un pointé manuel. Le sommet du cône est fixé au milieu du bord droit de l'image (base du cil). Il suffit alors de repérer les deux sommets du cône pour en déduire sa forme. À partir de ce gabarit, nous déduisons la longueur et l'ouverture de l'enveloppe du cil. Cependant, lorsque l'enveloppe du cil n'est pas clairement définie même visuellement, il est possible de passer le cil considéré qui sera alors marqué comme *non analysé* pour la longueur et l'ouverture.

**Densité de cils** Nous utilisons donc la transformation sphérique pour calculer un diagramme de Voronoi de distribution des cils sur la sphère, à partir duquel nous estimons la surface occupée par chaque cil individuellement. Comme illustré figure 2.30, nous attribuons chaque point de l'espace au cil le plus proche, créant ainsi une zone délimitée pour chacun d'entre eux : nous obtenons alors la densité de cils locale au sein de cette vésicule. Pour le calcul de ce diagramme de Voronoi des points sur la surface de la sphère unitaire en 3D, nous utilisons le package Matlab `sphere_voronoi` de John Burkardt (Department of Scientific Computing, Florida State University). À partir de cette information générée de chaque vésicule, il est maintenant possible de les superposer par un simple moyennage et ainsi déterminer l'allure typique de la densité au sein de la vésicule. De par la transformation de l'ellipsoïde de la vésicule en une sphère unité et grâce à la conservation de la densité de surface, il nous est alors possible de déterminer la densité moyenne d'une vésicule typique.

Pour conclure cette section, nous avons implémenté diverses méthodes d'extraction permettant d'étudier la contribution des paramètres suivants : la motilité, l'orientation des cils, leur longueur, l'ouverture de leur cône et leur densité. L'optimisation et l'automatisation de la chaîne de traitement, notamment en terme de détection et de validation des paramètres, ont permis d'analyser plus de 4000 cils provenant de 100 vésicules chez l'embryon sauvage, et pour six cas perturbés à différents stades [31]. Nous disposons à ce stade de la chaîne d'une quantité importante d'informations brutes des paramètres biophysiques de la vésicule.

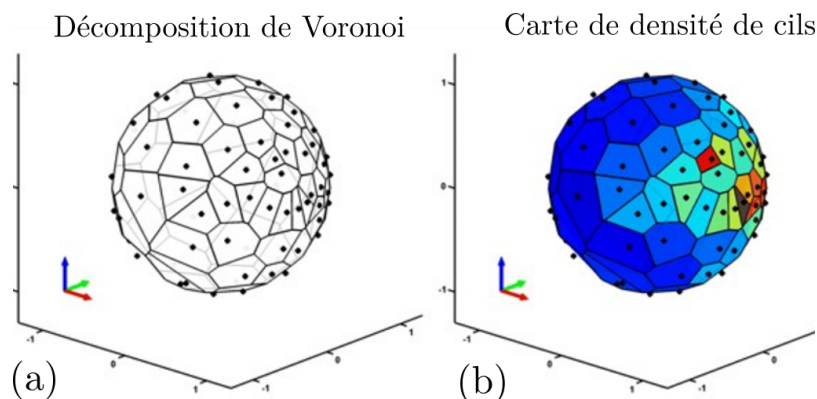


FIGURE 2.30: Décomposition de Voronoi de la distribution des cils sur la sphère. (a) On attribue chaque point de l'espace au cil duquel il est le plus proche, créant une partition de Voronoi. (b) Plus la surface est restreinte, plus la densité locale est forte.

L'enjeu est à présent de les visualiser et de les analyser en vue d'en tirer des conclusions biologiques.

### 2.2.5 Exploration des données et résultats biologiques

La dernière étape de la chaîne de traitement permet la mise en forme et visualisation des données. Jusqu'ici, l'analyse des vésicules a permis d'extraire numériquement une quantité importante de données sur les cils. Il s'agit désormais de les exploiter pour en tirer des conclusions biologiques pertinentes à l'échelle de la vésicule, par le biais de différentes formes de visualisations (graphes, cartes, histogrammes) et d'analyses statistiques. Dans cette section, nous nous proposons de présenter les résultats biologiques obtenus grâce à l'automatisation de l'algorithme ainsi implémenté. En particulier, nous sommes parvenus à découvrir une nouvelle forme de chiralité au cours du développement de la vésicule entre les stades 3 somites et 14 somites. Nous illustrerons ces résultats au moyen des techniques de visualisation et d'analyses statistiques développées spécifiquement pour ce problème.

Le contexte biologique est alors le suivant : la vésicule de Kupffer est l'organisateur gauche-droite chez le poisson-zèbre, l'organe responsable de l'amplification de la chiralité de l'échelle moléculaire des cils jusqu'à celle de l'organisme entier. La question de la brisure de symétrie au sein même de la vésicule est une étape qu'il est crucial d'étudier, afin de pouvoir affirmer qu'elle est un véritable organisateur gauche-droite. Pour ce faire, nous proposons de répondre à la question biologique suivante : *Comment s'établit la chiralité au sein de la vésicule ? Quels sont les paramètres qui véhiculent l'information d'asymétrie de l'échelle moléculaire à l'échelle de la vésicule, permettant l'événement de brisure de symétrie initial ?*

Pour y répondre, nous étudierons la symétrie de tous les paramètres que nous avons pu quantifier au sein de la cavité, en vue de détecter un comportement chiral chez l'un d'entre eux. Cette étude se conduira au moyen de méthodes de visualisations astucieuses et d'analyses statistiques, sur un nombre conséquent de cils et de vésicules. Il en résulte que parmi tous les paramètres étudiés, nous avons découvert que seule la distribution de l'orientation des cils était chirale à l'échelle de la vésicule. Dans la suite, nous démontrerons l'établissement de cette chiralité de l'orientation des cils au sein de la vésicule. Ensuite, nous utiliserons des embryons mutants pour tenter d'isoler certaines fonctions et paramètres indispensables à l'établissement la brisure de symétrie.

### 2.2.5.1 Chiralité de l'orientation des cils : $\phi$ et $\theta$

Comme nous l'avons établi à la section introductive 2.1.2, la direction du flux généré par le cil dépend de l'orientation de son axe d'inclinaison. De fait, l'orientation des cils est une caractéristique dont la propriété de chiralité semble intéressante à explorer. En effet, il paraît probable que le flux circulaire ait une influence sur l'orientation des cils et les oriente de manière chirale, en adéquation avec la direction du flux. Par ailleurs, il est à rappeler que Ferreira et al. [27] décrivent l'hypothèse de la mécanosensation du flux par les cils comme improbable : la force engendrée par le moment de torsion du cil sur le liquide de la vésicule est largement prépondérante face à l'action du flux sur le cil, ce qui vient contredire cette hypothèse. Il est alors crucial d'étudier l'orientation des cils dépendamment de l'absence ou la présence du flux dans la vésicule, à différents stades de développement de l'embryon. Nous proposons alors, grâce à l'exploration de nos données, de répondre aux questions suivantes : *La distribution angulaire de  $\phi$  et  $\theta$  est-elle chirale ? Comment évolue-elle au cours du temps et relativement au flux dans la vésicule ?* La plupart des résultats exposés dans la suite ont été publiés dans [31].

**La vésicule de Kupffer est chirale au stade 9-14 somites** Dans cette partie, nous tenterons d'établir un premier résultat biologique important : *aux stades 9-14 somites, la vésicule est-elle chirale ?* À ces stades, le flux dans la la cavité est bien établi.

**Angle moyen et angle du cil moyen** L'étude de l'orientation des cils au sein de la vésicule est un problème complexe : il requiert de comparer des vecteurs 3D dans l'espace, par ailleurs implantés sur un ellipsoïde. Cette géométrie singulière complique l'étude des orientations. Pour le problème, nous préférons dans un premier temps découpler l'analyse de  $\phi$  et  $\theta$ , nous permettant ainsi de travailler en géométrie circulaire, dont les outils de visualisation et d'analyse sont plus répandus. Pour la visualisation, l'utilisation d'histogrammes circulaires (*Rosette plot*) permet d'estimer la probabilité d'occurrence des tranches angulaires sur les angles  $\phi$  et  $\theta$ . Pour rappel, l'angle  $\theta$  correspond à l'angle du cil par rapport à la normale à la surface de son implantation sur la cellule (figure 2.24). Cet angle, défini entre 0 et  $\frac{\pi}{2}$ , n'a d'influence directe que sur l'amplitude du flux. L'angle  $\phi$  en revanche, défini entre 0 et  $2\pi$ , exprime l'orientation du cil projeté sur la surface (le cil est orienté suivant le méridien pour  $\phi = 0$ ) et influe directement sur l'orientation du flux. Nous comparons alors les distributions angulaires entre les cils implantés sur l'hémisphère droit de la vésicule, et ceux implantés sur l'hémisphère gauche. La représentation en histogramme donne un aperçu de la dispersion de la distribution angulaire, de même qu'une information sur sa valeur moyenne.

Une autre manière de présenter l'information angulaire peut être cependant utilisée, en représentant **l'angle du cil moyen**. Rappelons que, dans le cadre physique d'un écoulement de Stokes, le flux net total est linéairement dépendant de la contribution sommée des cils individuels. Ainsi, du point de vue du flux généré, la superposition des cils compris dans un hémisphère de la vésicule peut être approximée par son cil moyen en trois dimensions (moyenne des vecteurs 3D). Les angles associés du cil moyen ainsi calculés dans la base locale sont désignés comme  $\phi_{avg}$  et  $\theta_{avg}$ . Cette représentation possède l'avantage de ne pas découpler les angles  $\phi$  et  $\theta$  comme le fait la représentation précédente. En effet, pour un cil dont l'angle  $\theta$  est proche de 0, l'orientation  $\phi$  n'a que peu de sens ; on bruite alors la distribution de  $\phi$  pour la représentation en histogramme. On s'affranchit de ce problème lorsqu'on considère la nature tridimensionnelle du cil par le calcul du cil moyen.

**Chiralité de l'angle  $\phi$**  L'image (a) figure 2.31 décrit la répartition angulaire des cils, provenant la partie gauche et la partie droite de la cavité chez le poisson sauvage. Dans cette représentation, une vésicule présentant une symétrie miroir selon l'axe gauche-droite serait telle que  $\phi^L = -\phi^R$  et  $\theta^R = \theta^L$ . Cependant, pour l'histogramme circulaire des données

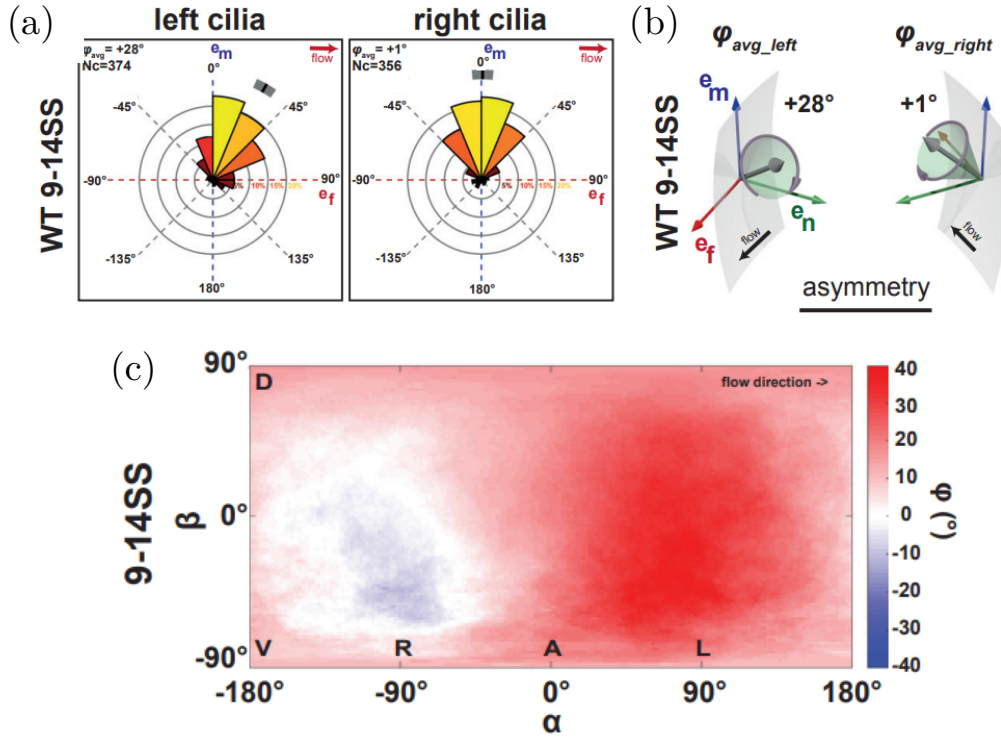


FIGURE 2.31: Chiralité de l'orientation des cils de la vésicule aux stades 9-14 somites. (a) Représentation en histogramme circulaire de l'orientation  $\phi$  des cils. (b) Schématisation des cils de chaque hémisphère présentant les angles du cil moyen. (c) Carte de densité angulaire pour  $\phi$ . Tiré de [31].

agrégées entre le stade 9 et 14 somites, on observe que les cils de l'hémisphère gauche sont nettement orientés suivant la direction du flux ( $\phi^L = +28^\circ$ ), tandis que ceux de l'hémisphère droit sont rigoureusement orientés le long du méridien ( $\phi^R = +1^\circ$ ). L'inclinaison des cils est en revanche équivalente à gauche et à droite telle que  $\theta^L = \theta^R$ . De fait, il semble évident qu'à ce stade, la vésicule n'est pas miroir symétrique, puisqu'elle ne respecte pas le critère  $\phi^L = -\phi^R$ . À partir de l'interprétation qualitative de ces histogrammes circulaires, il paraît alors clair que la vésicule au stade 8 somites est chirale. La carte de densité angulaire (c) permet de s'en convaincre d'avantage : le côté gauche semble présenter un fort biais pour les angles  $\phi^L > 0^\circ$ , tandis que les valeurs du côté droit est plus proche de  $\phi^R = 0^\circ$ .

Cependant, pour pouvoir affirmer ceci, il faut en toute rigueur s'assurer de la significativité statistique de ce résultat. Grâce à l'automatisation de la chaîne de traitement, nous avons alors pu collecter un nombre important de cils à chacun des stades étudiés. Dans cet exemple précis, nous disposons de près de 400 cils provenant de chaque hémisphère : c'est une quantité suffisante à l'analyse statistique du problème.

**Analyse statistique** Pour affirmer la significativité statistique du résultat de la chiralité aux stades 9-14 somites, il faut alors conduire une analyse statistique. Il s'agit ici de démontrer que l'hypothèse nulle  $H_0$  "La vésicule aux stades 9-14 somites est miroir-symétrique" ( $\phi^L = -\phi^R$  et  $\theta^R = \theta^L$ ), est au vu des données dont nous disposons, très improbable. Dans le cas général, ce type d'analyses est conduit au moyen de tests statistiques dont les hypothèses sont bien connues. Ces tests sont construits mathématiquement et sur-mesure en fonction de celles-ci ; en règle générale, il est possible de trouver un test pertinent au format de ses données et au type de conclusion statistique que l'on souhaite explorer. Dans le cas d'une distribution circulaire, comme c'est le cas pour les histogrammes angulaires, les tests dispo-



nibles sont alors spécifiques à la configuration cyclique. Bien que moins fréquemment utilisés que leurs homologues linéaires, ces tests ont été implémentés numériquement (en MATLAB notamment) et sont prêts à l'emploi. Le module MATLAB `circstat` développé Philipp Berens permet la réalisation de ces tests circulaires 1D.

Toutefois, le problème de l'orientation des cils est un problème intrinsèquement tridimensionnel. Celui-ci requiert l'utilisation de **statistiques sphériques**, dont les ressources restent très lacunaires. À ce jour, il n'existe aucun outil disponible d'analyse statistique sphérique prêt à l'usage et la littérature sur le sujet est rare. Par ailleurs, pour être utilisée rigoureusement, la plupart de ces tests nécessite des hypothèses fortes sur la nature de la distribution utilisée. Pour pallier au problème, nous avons donc utilisé un autre type de test statistique : les **tests de permutations** [46]. Ceux-ci proposent d'estimer la distribution d'un paramètre considéré, en calculant un grand nombre de ses valeurs possibles. C'est une méthode qui fonctionne très bien lorsque les données sont abondantes, et permet de ne pas présupposer de la forme de la distribution, celle-ci étant estimée lors du test. La question de la chiralité de la vésicule au stades 9-14 somites s'étudie comme suivant : nous définissons la métrique  $D = |\phi_{avg}^L - \phi_{avg,miroir}^R|$  comme étant la norme de la différence de l'orientation du cil moyen de l'hémisphère gauche  $\phi_{avg}^L$  et celui de l'hémisphère droit ayant subi une symétrie miroir  $\phi_{avg,miroir}^R$ . Pour obtenir une estimation de la distribution de cette métrique, nous mélangeons un grand nombre de fois (300000 fois par exemple) les cils provenant du côté gauche et droit et recalculons la valeur de  $D$  à chaque itération dans cette nouvelle configuration. La figure 2.32 représente la distribution ainsi estimée. Finalement, nous calculons la valeur  $D_{Ves}$  correspondant à l'estimation expérimentale, à partir des cils effectivement implantés dans l'hémisphère gauche et droit. Si la valeur de  $D_{Ves}$  est plus grande que la plupart des autres valeurs aléatoires, il y a alors de bonnes chances que la différence de la configuration réelle soit significative : c'est une estimation de la valeur p. Dans ce cas, on peut alors affirmer que  $\phi_{avg}^L \neq \phi_{avg,miroir}^R$  : cela signifie que la distribution de l'orientation des cils dans la vésicule est chirale.

Les résultats sont également présentés sur la figure 2.32. Dans le cas de la vésicule du type sauvage au stade 8 somites, on arrange 300000 configurations de répartition gauche-droite des cils à partir des données disponibles. Pour chacune d'entre elle, on calcule la différence  $|\phi_{avg}^L - \phi_{avg,miroir}^R|$  entre l'angle du cil moyen gauche et l'angle du cil moyen droite par symétrie miroir, ce qui permet de construire la distribution supposée de cette métrique. Nous la comparons finalement avec la valeur expérimentale : celle-ci est repérée par l'axe vertical rouge sur le graphe et est plus extrême que plus de 99.9% des valeurs générées aléatoirement. Nous pouvons alors affirmer avec confiance que cette valeur est significative et que  $\phi_{avg}^L \neq \phi_{avg,miroir}^R$ . Nous pouvons alors conclure statistiquement de la chiralité de la vésicule au stade 8 somites.

Pour conclure, les tests statistiques permettent de conclure ce que la visualisation en histogramme circulaire suggérait : au stade 9-14 somites où le flux est établi de manière robuste, la vésicule de Kupffer est chirale pour la distribution de l'orientation de cils.

**La chiralité s'établit entre le stade 3 et 8 somite** La question de l'établissement la chiralité au cours du développement de la vésicule découle naturellement de la conclusion précédente. Nous tenterons ici de répondre aux questions suivantes : *la vésicule est-elle chirale aux stades précoces de son existence ? Comment la chiralité s'établit-elle au cours du temps ?*

Pour y répondre, nous avons ici encore utilisé la visualisation en histogrammes circulaires associés aux tests de permutations. Les résultats sont présentés à la figure 2.33. En A, sont comparés les histogrammes de distribution de l'orientation pour les stades 3 somites et 8 so-

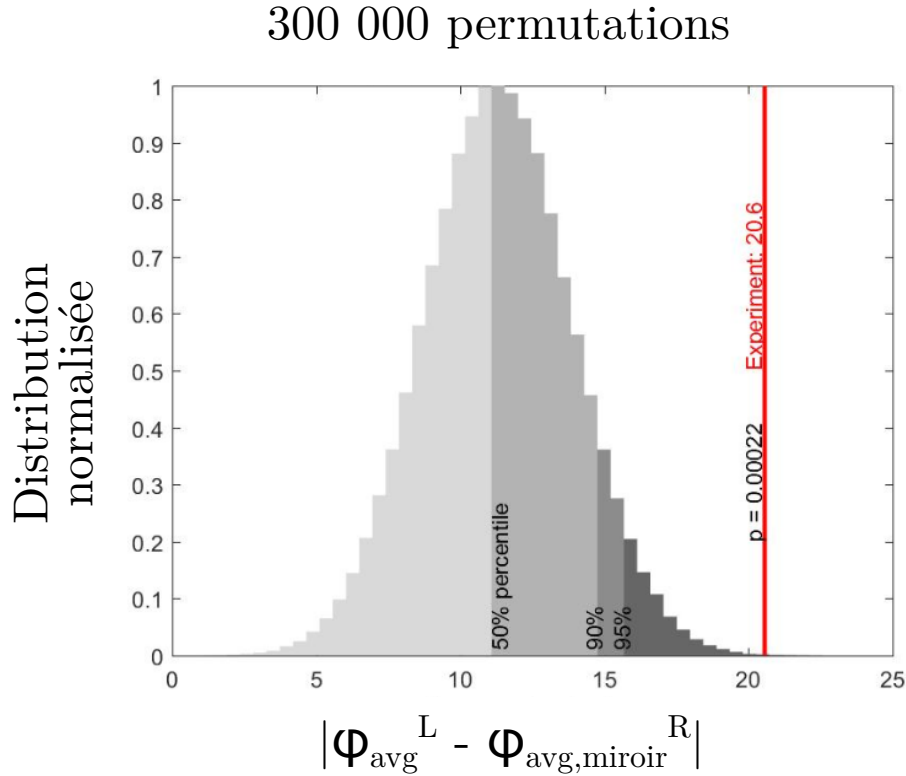


FIGURE 2.32: Test de permutation pour l'analyse de la chiralité de la vésicule au stade 8 somites. 300000 réarrangements gauche-droite ont été testés pour la valeur de la différence  $|\phi_{avg}^L - \phi_{avg,miroir}^R|$ . La valeur calculée associée aux données expérimentales est plus extrême que 99.9% des combinaisons aléatoires (valeur  $p < 0.001$ ). Cette valeur est alors très probablement significative et  $\phi_{avg}^L \neq \phi_{avg,miroir}^R$ .

mites ; l'analyse à 3 somites comporte 173 cils et celle à 8 somites 283. À 3 somites, on observe que la moyenne des distributions gauche et droite semblent opposées par rapport à  $\phi = 0^\circ$ , tandis que celle à 8 somites présente un fort biais dans la direction du flux. Qualitativement, la configuration à 3 somites semble respecter le critère de symétrie miroir  $\phi^L = -\phi^R$  alors que la vésicule à 8 somites présente une répartition chirale. Ce résultat est confirmé statistiquement à l'image C, présentant les valeurs  $p$  estimées par le test de permutation, pour le critère de la symétrie miroir aux stades 3, 6, 8 et 9-14 somites ( $H_0$  = la vésicule est miroir symétrique). À 3 somites, la valeur  $p$  vaut 0.56 ce qui ne permet pas de rejeter l'hypothèse  $H_0$ . La valeur de  $p = 0.082$  à 6 somites ne permet toujours pas de rejeter l'hypothèse de miroir symétrie. En revanche, les valeurs de  $p$  à 8 somites et après sont largement en deçà du seuil de décision ( $p = 0.05$ ), nous permettant de conclure de la chiralité de la vésicule à ces stades.

Ainsi, nous pouvons conclure que la chiralité s'établit entre les stades 3 et 8 somites. Au début de son existence, la cavité est symétrique selon l'axe gauche-droite. Peu à peu, les cils s'orientent légèrement dans la direction du flux direction et présentent une configuration chirale dès le stade 8 somites. Ce comportement est en adéquation avec celui d'un organisateur gauche-droite : la vésicule de Kupffer semble effectivement être un générateur d'asymétrie gauche-droite.

### 2.2.5.2 Un exemple de mutant : perturbation de la motilité

L'automatisation de la chaîne de traitement a largement facilité l'extraction de tous types de paramètres à partir des images brutes de vésicules. Ainsi, de par la vitesse de traitement

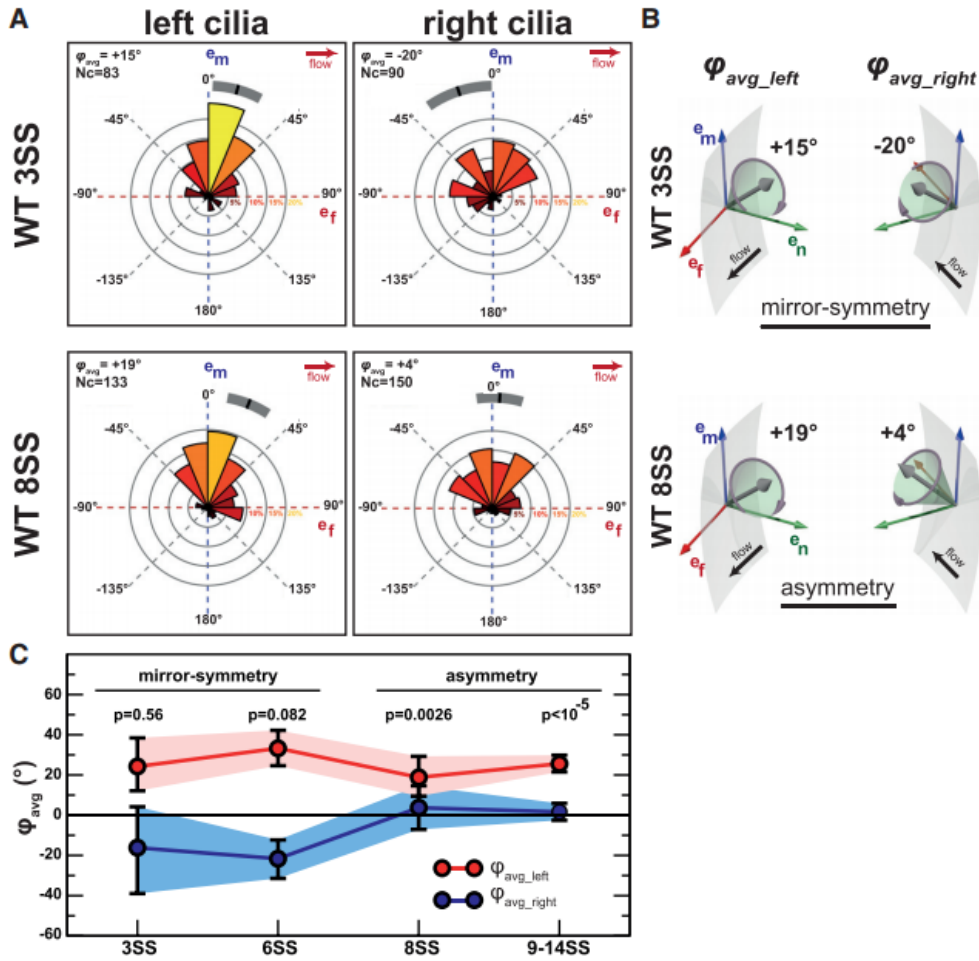


FIGURE 2.33: Établissement de la chiralité dans la vésicule de Kupffer du type sauvage au cours du temps. (A) Représentation en histogramme circulaire de l'orientation  $\phi$  pour les cils gauche et droite aux stades 3 et 8 somites. (B) Schématisation des cils gauche et droite présentant les angles du cil moyen. (C) Évolution de l'angle  $\phi_{avg}$  au cours du temps, et significativité statistique du test de symétrie miroir. Tiré de [31].

nous avons pu conduire des analyses sur six cas perturbés [31]. Dans la suite nous choisissons de présenter spécifiquement les résultats associés à l'un d'entre un : un mutant pour qui la motilité est perturbée. Grâce à lui, nous tenterons d'identifier les paramètres cruciaux à l'établissement de la chiralité.

**Une chiralité s'établit même sans motilité ni flux** Dans la section précédente, nous décrivions qu'aux stades tardifs de la vésicule, les cils présentent un biais d'orientation dans la direction du flux. Un lien pourrait alors exister entre ces deux paramètres : le flux établi semble réguler l'orientation des cils au cours du développement. Pour étudier cette interaction, nous nous proposons d'étudier le mutant *dnaaf1<sup>-/-</sup>* pour lesquels les moteurs de dynéine sont non fonctionnels (Tg(*dnaaf1tm317b*; *actb2*:Mmu.Arl13b-GFP) [47]) : chez ces embryons, les cils motiles sont immobiles.

Les résultats de l'analyse sont présentés figure 2.34. Le premier résultat important est qu'au stade 3 somites, la vésicule est symétrique mais devient chirale au stade 8 somites, et ce, en l'absence de motilité des cils et donc de flux. De manière surprenante, le biais

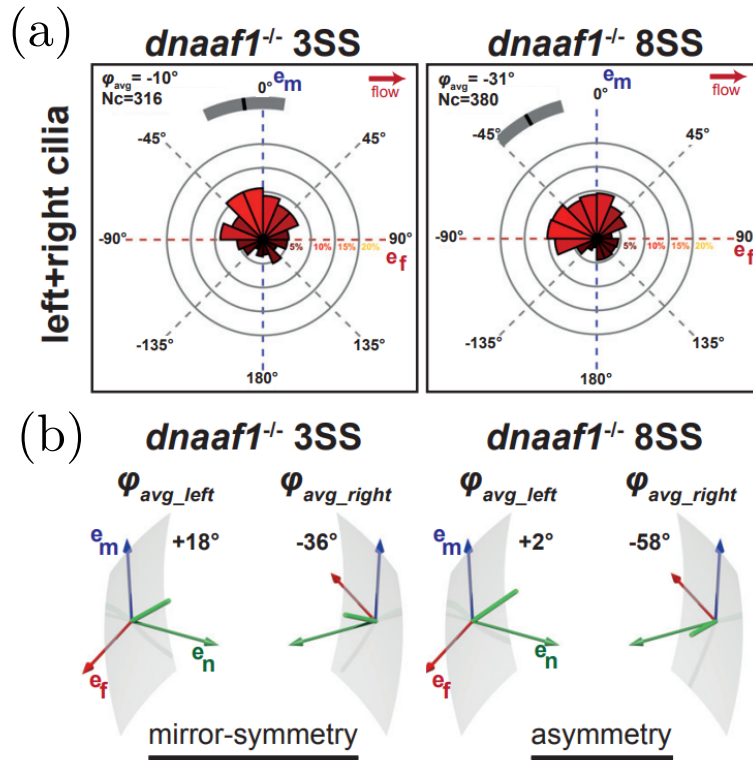


FIGURE 2.34: Établissement de la chiralité dans la vésicule de Kupffer du mutant *dnaaf1*<sup>-/-</sup> entre le stade 3 et 8 somites. (a) Au stade 3 somites, la distribution des angles  $\phi$  est centrée sur 0. Aux stades plus tardifs, elle s'oriente vers les angles  $\phi < 0^\circ$ , dans la direction opposée de la tendance observée chez le type sauvage. (b) Représentation tridimensionnelle des cils présentant les angle du cil moyen. Tiré de [31].

d'orientation s'effectue dans une direction opposée à celui observé chez le type sauvage : ici, pour des angles  $\phi < 0^\circ$ . Ces résultats ont été confirmés par l'analyse statistique par tests de permutations et peuvent être trouvés dans [31]. Elle permet de dégager le résultat suivant : l'établissement de la distribution chirale de l'orientation des cils au sein de la vésicule existe même sans flux.

**La chiralité de l'orientation des cils ne dépend pas que de la position des corps basaux** Chez la souris, une explication avancée de l'inclinaison postérieure des cils est que ceux-ci sont implantés asymétriquement sur la cellule par rapport à l'axe antéro-postérieur (figure 2.5). Dans ce paragraphe, nous allons tenter d'établir s'il existe un lien entre la chiralité de l'orientation des cils et le positionnement de leur corps basal au sein des cellules.

**Analyse numérique des corps basaux** Pour cette étude, de nouvelles acquisitions au stade 8 somites ont été réalisées afin de révéler au sein de la même image le contour et les corps basaux de chaque cellule de la vésicule de Kupffer (protocole détaillé dans [31]). À partir de celles-ci, on repère manuellement les corps basaux. Une routine MATLAB permet alors, pour chaque corps basal repéré, de projeter dans le plan tangent à la vésicule (au moyen des positions des corps basaux proches) le signal du contour cellulaire, présenté figure 2.35. À partir de celui-ci, on peut alors détourner le contour cellulaire manuellement au moyen d'une interface utilisateur. Le déplacement du corps basal par rapport aux étendues de la cellule dans les directions antéro-postérieure et gauche-droite peuvent être calculées en 3D, puis projetées sur leurs axes d'intérêt (antéro-postérieur et gauche-droite, AP et RL respectivement). Nous avons ainsi pu déterminer le déplacement des corps basaux pour près de 75% des cils

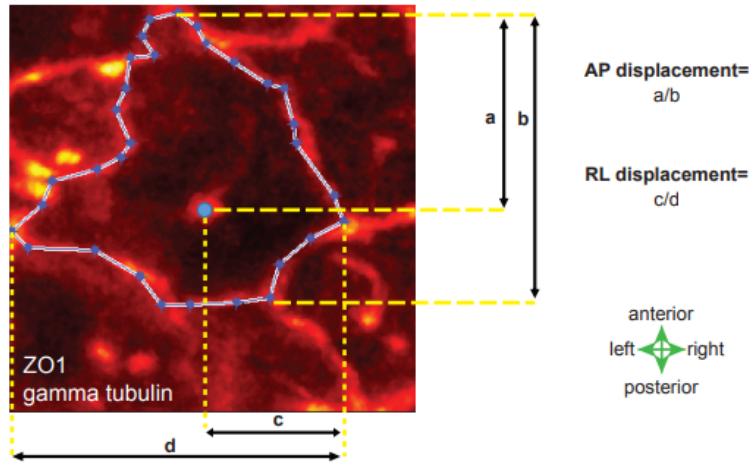


FIGURE 2.35: Procédure d'extraction des corps basaux dans la vésicule de Kupffer. Sur une projection du plan de la cellule, on détoure manuellement les contours de la cellule. Le corps basal est alors comparé avec les étendues antéro-postérieures et gauche-droite de la cellule, pour en établir le déplacement dans ces axes. Tiré de [31].

totaux observés sur les vésicules ainsi montées.

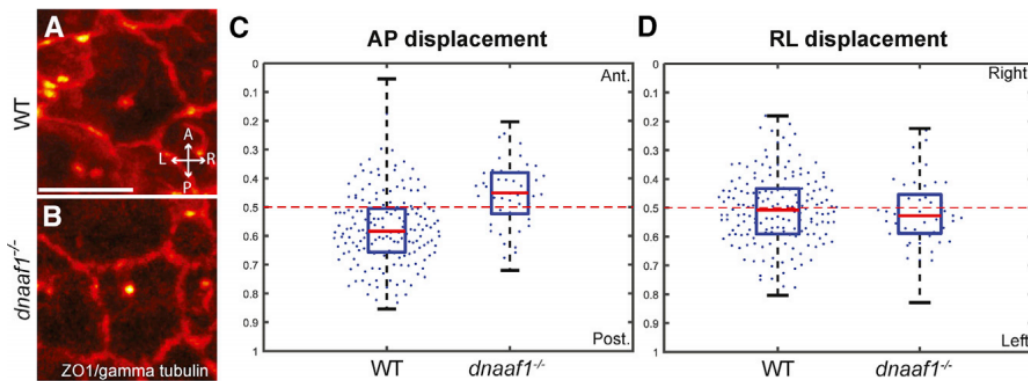


FIGURE 2.36: Déplacement des corps basaux relativement à l'étendue de la cellule dans les axes AP et RL. (A) et (B) caractérisent les configurations typiques des cas sauvage et du mutant *dnaaf1*<sup>-/-</sup>. Tiré de [31].

**Résultats** Cette étude a permis de comparer l'implantation des corps basaux chez le type sauvage (wt) et le mutant *dnaaf1*<sup>-/-</sup>. Une partie des résultats est exposée à la figure 2.36 : de ceux-ci, on peut dégager deux conclusions. D'abord, dans les deux cas on observe que l'implantation des corps basaux est symétrique selon l'axe gauche-droite (D) pour les cellules de l'hémisphère gauche comme de l'hémisphère droit ( $p > 0.15$  pour tous les cas). Cela présuppose que l'orientation chirale des cils n'est pas uniquement dépendante de la position du corps basal au sein de cellule. En revanche, les types sauvages présentent un léger biais dans la direction postérieure (C) déjà observé dans la littérature [48]. Chez *dnaaf1*<sup>-/-</sup> en revanche, les analyses statistiques suggèrent l'absence de biais dans l'axe AP, et donc une éventuelle interdépendance entre la position des corps basaux et de l'orientation.

Pour conclure, la position des corps basaux n'est vraisemblablement pas la seule cause de l'orientation chirale des cils, bien qu'il semble exister un lien entre ces deux paramètres.

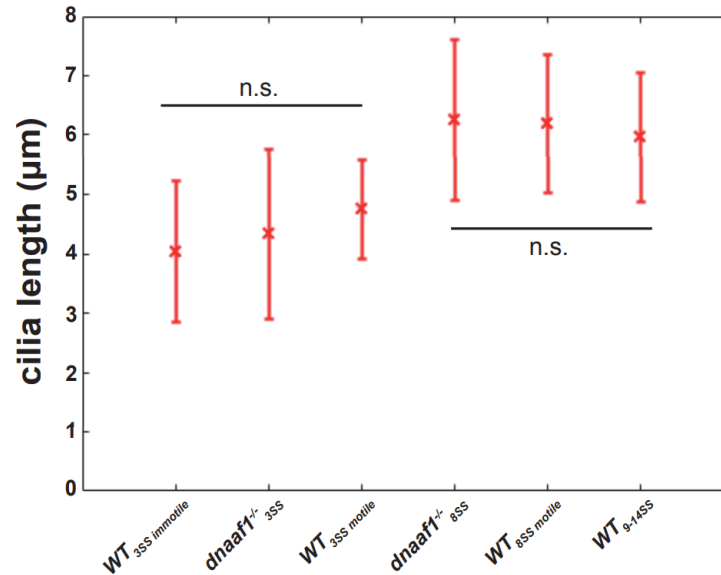


FIGURE 2.37: Évolution de la longueur des cils au cours du temps, chez le sauvage et le mutant *dnaaf1*<sup>-/-</sup>. Il n'y a pas de différence statistique significative entre les cils à 3 somites, ni entre ceux des stades plus tardifs. La différence de longueur entre stades différents est quant à elle significative. Tiré de [31].

**La longueur des cils augmente au cours du développement** Parmi les paramètres que nous avons extraits se trouve notamment la détection semi-automatisée de la longueur des cils. Dans ce paragraphe, nous souhaitons illustrer par ailleurs l'évolution de la taille des cils en fonction du stade et de la motilité. La figure 2.37 recense les résultats obtenus de longueur des cils chez le type sauvage ou le mutant *dnaaf1*<sup>-/-</sup>, à différents stades, pour les cils motiles et immotiles. Nous avons ainsi pu déterminer que la longueur des cils de la vésicule semble être uniquement conditionnée par le stade de développement. Statistiquement, on ne décele pas de différence significative entre les cils des différentes configurations (motilité, sauvage ou mutant) au stade 3 somites. Il en va de même pour les cils à 8 somites. On peut en revanche affirmer que les longueurs à 3 et 8 somites sont significativement différentes. En conclusion, il semble que la longueur des cils ne dépend que du stade de développement de la vésicule de Kupffer et n'a pas de lien avec la motilité.

**Conclusion** Dans cette section, nous avons passé en revue quelques conclusions biologiques dont l'étude, notamment statistique, a été rendue possible par l'amélioration de la chaîne de traitement. Parmi les paramètres biophysiques étudiés, nous avons détaillé ici quelques résultats importants à la caractérisation de l'établissement de d'une nouvelle forme d'asymétrie au sein de la vésicule de Kupffer, en particulier au cours du temps (figure 2.38). Nous avons ainsi confirmé que la vésicule se comporte comme un vrai organisateur gauche-droite et est le lieu de l'évènement de brisure de symétrie initial. Cette nouvelle forme de chiralité de l'orientation des cils apparaît entre les stades 6 et 8 somites de manière graduelle, et ne paraît pas dépendre du flux généré dans la cavité pour s'établir. Cette découverte ouvre sur de nouvelles questions, notamment sur son rôle dans l'établissement de l'axe gauche-droite de l'embryon.

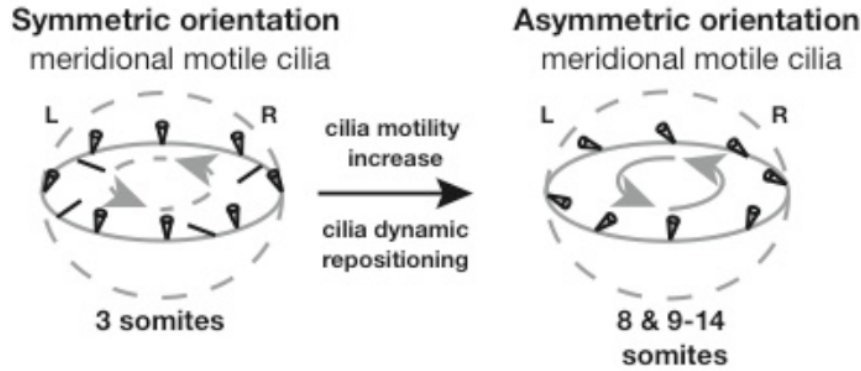


FIGURE 2.38: Établissement de la chiralité des orientations des cils au cours du temps, entre les stades 3 et 8 somites. Tiré de [31].

## 2.3 Perspectives

### 2.3.1 Vers une simulation de la vésicule de Kupffer

Dans la section 2.2.2, nous avons décrit la procédure permettant de générer numériquement l'image d'un cil unique battant, à la manière des acquisitions que nous conduisons. Comme il l'a été décrit, ces simulations sont utiles à la compréhension approfondie des artefacts de balayage de même qu'à la caractérisation de certaines étapes de la chaîne de traitement (détection d'orientation, influence du RSB, etc.). L'extension directe de la simulation de cils uniques est alors la génération de vésicules entières. Les avantages sont nombreux : d'abord, permettre de valider les performances de certains autres aspects de la chaîne de traitement (en particulier l'automatisation de l'extraction de paramètres, décrite au 2.2.4). Ensuite, permettre à l'avenir l'entraînement d'algorithmes d'apprentissage automatique à même les vésicules, discutés section 2.3.2.

Nous avons déjà réalisé des essais préliminaires de simulations. La procédure de simulation d'une vésicule entière est basée sur la simulation d'un cil unique. À nouveau, on peut ici scinder la simulation en deux étapes distinctes : d'abord la *génération* du squelette de la vésicule et de ses paramètres à partir des données expérimentales collectées, afin que celle-ci soit la plus représentative possible d'une vésicule biologique (détermination des paramètres de taille, forme, distribution et orientation des cils). Ensuite, il s'agit de reproduire numériquement la procédure d'imagerie, source des artefacts de balayage caractéristiques de nos acquisitions. En d'autres termes, *simuler l'acquisition*.

**Génération de la vésicule** Chacun des paramètres associés à la vésicule est sujet à une forme de dispersion. Pour la plupart, elle peut être approximée par une gaussienne : c'est le cas notamment de la taille des axes de la vésicule, du ratio entre eux, ou encore de la fréquence de battement des cils. En revanche, la distribution des certains paramètres est plus complexe à modéliser. C'est notamment le cas des paramètres critiques tels que l'orientation des cils décrite précédemment, ou encore la distribution spatiale des cils au sein de la cavité. Comme nous l'avons décrit dans la section 2.2.1, on observe un gradient de densité de cils vers la direction antérieure de la vésicule. Une représentation fidèle de la cavité typique requiert de reproduire cette distribution non-uniforme pour les simulations également. Pour ce faire, il suffit d'utiliser les informations collectées sur les multiples vésicules analysées, et les transposer en une carte de densité de probabilité de cils à la surface de la vésicule ainsi

générée. Il en va alors de même pour les orientations, les longueurs, et potentiellement de tous les paramètres quantifiés par la chaîne de traitement.

**Simulation de l'acquisition** À partir du squelette de la vésicule ainsi généré, il nous faut désormais reproduire numériquement le fonctionnement d'une acquisition XYZ. Comme il l'a été décrit dans la section 2.2.2, elle consiste en un balayage point par point des voxels de l'image dans l'ordre des dimension X, puis Y, puis Z. Il faut alors, à chaque attribution séquentielle du niveau de signal à un voxel  $V_{x,y,z}$  de position  $(x,y,z)$ , bouger l'intégralité des cils présents dans la vésicule générée. Au voxel  $V_{x,y,z}$ , on assigne la contribution des cils adjacents convoluée par la PSF du système au point d'intérêt. La procédure permettrait ainsi de générer une image présentant les artefacts de balayage caractéristiques de cette étude. Un exemple de résultat préliminaire, convaincant visuellement, est exposé figure 2.39. Sur l'image (a) correspondant à la vésicule générée, on peut observer le gradient dorsal de densité de cils que nous avons détecté par la chaîne de traitement.

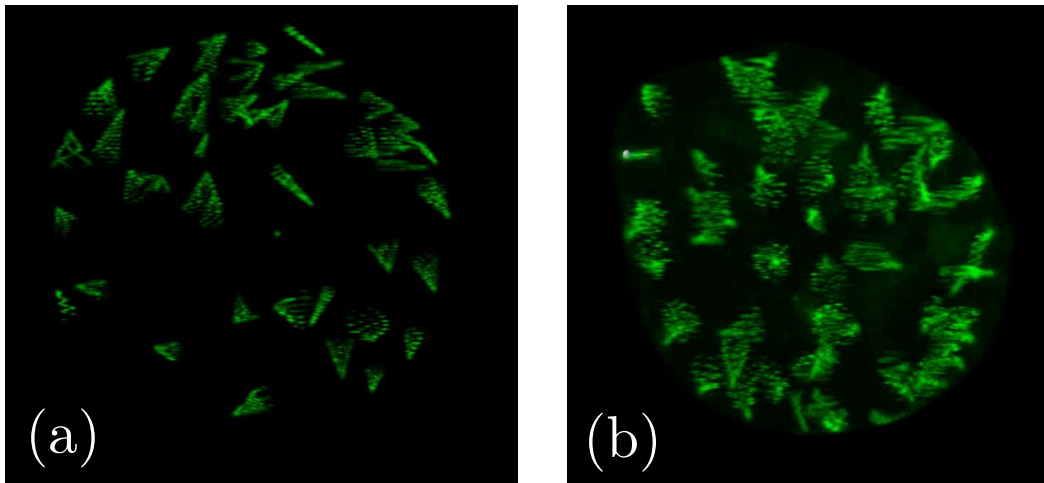


FIGURE 2.39: Comparatif d'une vésicule simulée numériquement à une vésicule réelle acquise au microscope. (a) Vésicule simulée. (b) Vésicule réelle.

Les performances de ces simulations peuvent cependant être largement améliorées. En particulier, la résolution axiale et latérale, de même que le RSB se dégradent avec la profondeur en Z. De la même manière que pour les autres paramètres, il nous serait utile de mesurer cette dégradation à partir des données expérimentales, pour ensuite les transposer aux simulations. Cela nous permettrait alors de pouvoir quantifier l'influence de la perte de résolution et de RSB sur les performances de détection notamment.

**Conclusion** La simulation de vésicules entières constitue un outil d'automatisation et caractérisation approfondi de la chaîne de traitement. L'objectif est à terme, de permettre l'extraction directe de paramètres d'images de vésicules, sans nécessiter d'étape de pointage manuel par un utilisateur. La quantité importante pouvant ainsi être générée nous permettrait de nous affranchir de l'étape fastidieuse d'acquisition, et offrirait un développement et une caractérisation plus rapide de ces perspectives d'amélioration de la chaîne de traitement. En particulier, et comme nous le détaillerons dans la section suivante, une application directe et prometteuse serait l'implémentation de détection et segmentation par apprentissage automatique. Ce développement pourrait dans un premier temps accélérer certaines tâches indépendantes de la chaîne, et à terme couvrir l'intégralité de la chaîne de traitement.



### 2.3.2 Amélioration de la chaîne de traitement par apprentissage automatique

La détection de la base des cils, ainsi que de leur orientation 3D dans la vésicule sont les deux étapes qui requièrent le plus de temps dans le traitement et l'analyse du flux de données. En effet, elles nécessitent une intervention manuelle de pointé ou de correction via le logiciel Imaris, et viennent briser la chaîne de traitement par ailleurs automatisée. Ceci fait que la segmentation semi-automatisée demeure à ce jour une étape longue et fastidieuse, mais surtout limitante pour l'analyse en nombre de nouvelles vésicules.

Pour les bases des cils, la méthode impose de les pointer manuellement en 3 dimensions grâce au logiciel Imaris. Les orientations sont quant à elles d'abord estimées grâce à une projection du signal sur une sphère, mais nécessitent une correction des cils mal orientés par l'utilisateur a posteriori. Ainsi, et comme détaillé dans la section 2.2.4, la détection de l'orientation a été optimisée au moyen d'un lissage du signal et d'un ajustement par une fonction de Von-Mises Fischer. Malgré les améliorations, la vitesse d'analyse demeure encore problématique et les résultats obtenus automatiquement sont en dessous de ceux provenant d'un pointé par un utilisateur expérimenté.

**Pertinence de l'utilisation de l'apprentissage automatique** Les enjeux de cette partie sont alors doubles : d'une part permettre d'automatiser entièrement la chaîne de traitement mais également de la rendre plus performantes sur ces tâches. Les deux aspects sont intrinsèquement liés : la détection automatique des bases accélérera la segmentation de manière drastique, quand de meilleurs résultats sur la détection des orientations permettront d'éviter une correction manuelle a posteriori. Toutefois, l'analyse manuelle a permis de soulever un point fondamental : ces problèmes qui paraissent simple à l'exécution pour un œil humain entraîné se révèlent ardu à décrire formellement et à implémenter au moyen d'approches algorithmiques classiques. Par ailleurs elle a également permis de pointer quelques milliers de cils, c'est-à-dire d'associer pour chaque image d'un cil en mouvement le vecteur d'orientation auquel il est associé. De par ces deux spécificités, l'utilisation d'apprentissage automatique s'impose comme une solution idoine au problème de la détection des cils. Avec cette méthode, il n'est pas nécessaire de décrire formellement le système pour permettre sa compréhension, à condition de détenir un nombre de données conséquent sur lesquelles s'entraîner [49]. Grâce à l'analyse exhaustive de dizaines de vésicules (4000 cils dont on connaît les paramètres) et grâce aux simulations, nous avons à notre disposition un nombre important de données et le résultat associé de leur détection : c'est le cas idéal d'un problème soluble par apprentissage supervisé.

**Amélioration d'étapes indépendantes** Du fait de la quantité de données annotées dont nous disposons, les applications des réseaux neuronaux au projet sont nombreuses. 4 étapes séquentielles se révèlent particulièrement intéressantes pour fluidifier la chaîne de traitement :

- La détection des cils dans l'image de la vésicule (régression)
- La détection des bases des cils (régression)
- La détection de l'orientation du cil (régression)
- La classification du type de cil : motile, immotile. (classification)

Ces étapes implémentées permettraient à une fonction qui prendrait l'image tridimensionnelle d'une vésicule complète, de détecter les cils puis de retourner leur positions, orientations ainsi que s'ils sont motiles ou non.

**Détection des cils dans l'image de la vésicule :** C'est ici un problème classique de détection d'objet dans une image auquel les techniques d'apprentissage automatique peuvent

répondre. Usuellement, on repère une zone d'intérêt (*bounding box*) autour de l'objet, afin de définir son étendue spatiale dans toutes les directions de l'espace. Ici, il s'agirait de créer une "boite" 3D autour du cil, ce qui permettrait ensuite d'extraire une image recadrée en contenant un seul. Le principe est illustré figure 2.40.

## Object Detection

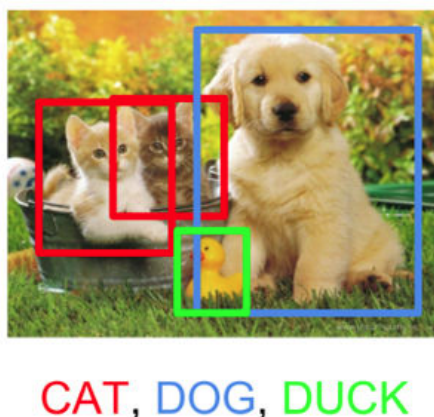


FIGURE 2.40: Détection et étiquetage de régions d'intérêt. La technique pourrait détecter l'étendue tridimensionnelle des cils dans la vésicule, de même son type. Tiré de [www.datacamp.com](http://www.datacamp.com).

**Détection de la base du cil :** À partir d'une image recadrée autour d'un seul cil, il est possible d'entraîner un réseau de neurones, par exemple, à repérer la base du cil en trois dimensions. Il s'agit ici d'un problème de régression, où l'on cherche à déterminer la position  $(x,y,z)$  de la base du cil dans cette image extraite. Il est ensuite possible de retrouver les coordonnées réelles du cil dans le référentiel de l'image de la vésicule, grâce à la position de la bounding box.

**Détection de l'orientation du cil** De la même manière que pour la détection de la base, la détection de l'orientation se réduit à un problème de régression 3D sur l'image recadrée. Par ailleurs, connaissant par l'étape précédente l'origine du cil, il suffit alors de déterminer les coordonnées  $(v_x,v_y,v_z)$  du vecteur dans l'espace à partir des voxels de l'image.

**Classification du type de cil** Pour cette dernière étape, il s'agit de classer les cils entre deux catégories : motiles ou immotiles. C'est un modèle bien connu de classification pour lesquels les réseaux de neurones sont des outils privilégiés, comme présenté figure 2.40.

**L'apprentissage automatique : une perspective prometteuse** Les problèmes de détection détaillés précédemment sont parfaitement adaptés à l'utilisation de réseaux neuronaux : ce sont des problèmes complexes à formaliser du point de vue algorithmique, dont la quantité de données annotées permettrait tout à fait d'entraîner, par exemple, un réseau de neurones très performant. Le nombre de cils et de vésicules nécessaires est alors directement dépendant de la complexité des tâches que l'on souhaite entreprendre ; il paraît alors clair que celles-ci sont, au vu de ce qui peut être réalisé par de telles méthodes, largement solubles par apprentissage automatique. Ainsi, ce pan du projet est extrêmement prometteur et pourrait offrir des résultats de vitesse de traitement et de performance de détection sans précédent.

Une implémentation très préliminaire à la détection de l'orientation des cils sur simulation permet alors de confirmer la pertinence de cette orientation du projet.

### 2.3.3 Vers l'imagerie 3D dynamique des cils

La chaîne de traitement 3D-CiliaMap permet l'extraction de paramètres biophysiques d'un nombre conséquent de cils et de vésicules et de nous renseigner sur leur évolution au cours du temps. Cependant, et comme nous l'avons abordé à la section 1.3 du chapitre introductif, les limitations de vitesse inhérentes à la microscopie multiphoton point par point ne permettent pas la résolution de la dynamique du cil cellulaire. Ainsi, à ce jour, nous n'avons pas accès à une représentation tridimensionnelle du mouvement d'un cil battant dans la vésicule de Kupffer. En particulier, nous n'avons encore jamais observé expérimentalement le mouvement conique incliné présenté à la figure 2.8. De récentes études ont suggéré par des simulations que le battement privilégié d'un cil court serait le mouvement conique incliné, tandis qu'un cil plus long présenterait un mouvement en tire-bouchon [50]. Ceci est illustré à la figure 2. La direction du flux engendré de ces deux configurations est cependant très différente : la première permet la génération d'un flux orthogonal à son axe d'inclinaison, quand le battement en tire-bouchon génère un flux dans la direction de son axe. Ces considérations ont une influence forte sur la physique de génération du flux au sein de la vésicule de Kupffer. De plus, résoudre le mouvement du cil nous renseignerait d'informations cruciales et permettrait d'investiguer l'hypothèse de la mécanotransduction du cil [31].

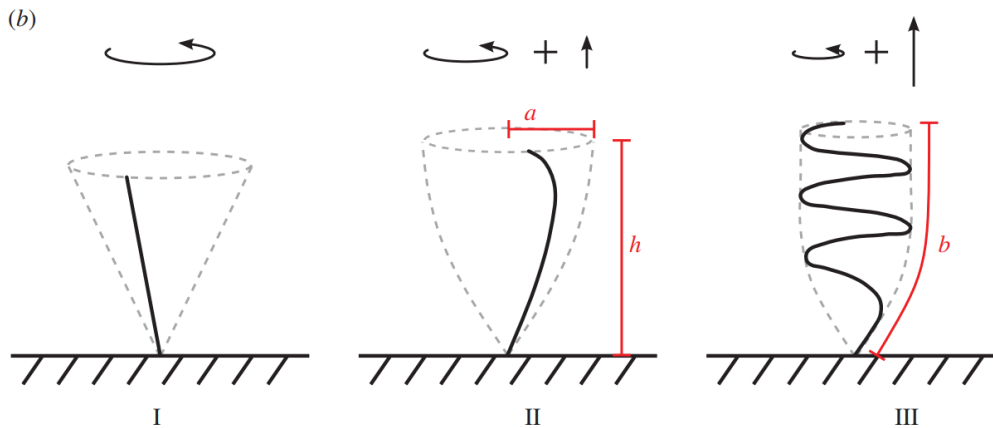


FIGURE 2.41: Hypothèse de la transition entre deux types de battements asymétriques spatiaux en fonction de la taille du cil. Lorsqu'il est court (I), il ne présente pas de courbure et bat avec un mouvement de cône incliné. Le flux généré est orthogonal à l'axe d'inclinaison. Lorsqu'il s'allonge (II), (III), le mouvement se mue progressivement en un battement en tire-bouchon avec une courbure prononcée. Adapté de [50].

Les artefacts de balayage, bien que riches en informations, sont ici limitants à l'imagerie rapide. Nous pouvons cependant noter que la résolution temporelle d'une seule ligne permet la bonne détection, ponctuellement, du cil battant. On peut alors considérer que les lignes de l'artefact de balayage sont simplement désordonnées les unes par rapport aux autres, et que leur réarrangement astucieux pourrait nous permettre de visualiser l'image du cil en mouvement. Dans le chapitre suivant, nous nous proposons d'exploiter cette idée, en utilisant de manière différente la propriété de périodicité des cils : nous y développerons la méthode d'imagerie XTYZ, permettant l'acquisition rapide de phénomènes périodiques en microscopie multiphoton point par point.

## 2.4 Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons amélioré la chaîne de traitement 3D-CiliaMap, en particulier la vitesse d'analyse et l'ergonomie de celle-ci. Grâce à ce développement, nous avons rendu le traitement des vésicules rapide, semi-automatisé et systématique. Elle permet maintenant d'agrèger une quantité importante de données, nécessaire à l'étude de ce système complexe : 100 vésicules, 4000 cils pour le type sauvage et 6 cas perturbés. Chaque étape du traitement a été optimisée. D'abord, la mise en correspondance des données permet la superposition de l'information provenant de cils, de vésicules indépendantes, grâce notamment à l'implémentation de l'outil *Reference Frame*. L'extraction ensuite, a été largement automatisée et rendue plus précise en particulier via l'étude de ses performances par simulations de cils individuels. Enfin, l'amélioration du flux d'extraction a permis de conduire une étude statistique par le biais de tests de permutations. Par celle-ci, nous assurons la significativité des résultats que nous avançons, aspect fondamental dans ce contexte biologique, tant la variabilité des paramètres caractérisant la vésicule de Kupffer est importante. Nous avons dégagé des tendances fortes et obtenu des résultats biologiquement significatifs, en particulier, nous avons découvert une nouvelle forme de chiralité s'établissant au cours du temps, qui ouvre sur de nouvelles questions relatives à l'hypothèse de mécanotransduction au cours de l'établissement de la polarité gauche-droite. Au bilan, les propriétés des cils motiles au sein de la vésicule de Kupffer sont plus généralement utilisées pour caractériser les phénotypes de mutants perturbant la ciliogenèse, ou impliquant une ciliopathie. Dans ce contexte, 3D-CiliaMap pourrait devenir un outil de routine pour quantifier ces propriétés de manière systématique. Dans cette perspective, une publication est en cours de rédaction [51]. Par ailleurs, au vu du nombre de cils que nous avons analysés au cours de ce projet, ce dernier semble tout à fait adapté au développement de techniques d'apprentissage automatisé. Par celles-ci, une chaîne de traitement complètement automatisée semble envisageable et pourrait constituer une solution idéale à l'amélioration de nombreuses étapes du processus. Les perspectives de développement sont nombreuses et permettraient de mettre encore d'avantage à profit les nombreuses données collectées par la chaîne de traitement.

Enfin, résoudre le mouvement tridimensionnel du cil serait riche d'informations, mais demeure un défi expérimental. Dans le chapitre qui suit, nous proposons une approche permettant de contourner les limitations de vitesse d'imagerie dans le cas du processus périodique de battement cardiaque. Les cils motiles partageant cette propriété de périodicité, nous y discuterons comment cette stratégie nous permettrait d'en résoudre la dynamique dans l'espace.

## 2.5 Références

- [1] Martin Blum, Axel Schweickert, Philipp Vick, Christopher V.E. Wright, and Michael V. Danilchik. Symmetry breakage in the vertebrate embryo : When does it happen and how does it work? *Developmental Biology*, 393(1) :109–123, sep 2014. 39
- [2] Manfred Fliegauf, Thomas Benzing, and Heymut Omran. When cilia go bad : cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11) :880–893, nov 2007. 38, 39, 40
- [3] Adam J Shapiro, Stephanie D Davis, Thomas Ferkol, Sharon D Dell, Margaret Rosenfeld, Kenneth N Olivier, Scott D Sagel, Carlos Milla, Maimoona A Zariwala, Whitney Wolf, Johnny L Carson, Milan J Hazucha, Kimberlie Burns, Blair Robinson, Michael R Knowles, Margaret W Leigh, and Genetic Disorders of Mucociliary Clearance Consortium. Laterality Defects Other Than Situs Inversus Totalis in Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest*, 146(5) :1176–1186, nov 2014. 38

- [4] Ann F. Ramsdell, Jayne M. Bernanke, John Johnson, and Thomas C. Trusk. Left-right lineage analysis of AV cushion tissue in normal and laterality defective *Xenopus* hearts. *The Anatomical Record Part A : Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 287A(2) :1176–1182, dec 2005.
- [5] Mardi J. Sutherland and Stephanie M. Ware. Disorders of left-right asymmetry : Heterotaxy and situs inversus. *American Journal of Medical Genetics Part C : Seminars in Medical Genetics*, 151C(4) :307–317, nov 2009. 38
- [6] You Li, Nikolai T. Klena, George C. Gabriel, Xiaoqin Liu, Andrew J. Kim, Kristi Lemke, Yu Chen, Bishwanath Chatterjee, William Devine, Rama Rao Damerla, Chienfu Chang, Hisato Yagi, Jovenal T. San Agustin, Mohamed Thahir, Shane Anderton, Caroline Lawhead, Anita Vescovi, Herbert Pratt, Judy Morgan, Leslie Haynes, Cynthia L. Smith, Janan T. Eppig, Laura Reinholdt, Richard Francis, Linda Leatherbury, Madhavi K. Ganapathiraju, Kimimasa Tobita, Gregory J. Pazour, and Cecilia W. Lo. Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature*, 521(7553) :520–524, may 2015. 38
- [7] B A Afzelius. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science (New York, N.Y.)*, 193(4250) :317–9, jul 1976. 38
- [8] Hannah M Mitchison and Enza Maria Valente. Motile and non-motile cilia in human pathology : from function to phenotypes. *The Journal of Pathology*, 241(2) :294–309, jan 2017. 39
- [9] Jose L. Badano, Norimasa Mitsuma, Phil L. Beales, and Nicholas Katsanis. The Ciliopathies : An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(1) :125–148, sep 2006. 39
- [10] Sarah C. Goetz and Kathryn V. Anderson. The primary cilium : a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*, 11(5) :331–344, may 2010. 41
- [11] Hiroaki Ishikawa and Wallace F. Marshall. Ciliogenesis : building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(4) :222–234, apr 2011. 39, 42
- [12] Laetitia Vincensini, Thierry Blisnick, and Philippe Bastin. 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biology of the Cell*, 103(3) :109–130, mar 2011. 39
- [13] Brent W Bisgrove and H Joseph Yost. The roles of cilia in developmental disorders and disease. *Development (Cambridge, England)*, 133(21) :4131–43, nov 2006. 39
- [14] S Nonaka, Y Tanaka, Y Okada, S Takeda, A Harada, Y Kanai, M Kido, and N Hirokawa. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 95(6) :829–37, dec 1998. 39, 41
- [15] Nicolas F. Barbari, Amber K. O'Connor, Courtney J. Haycraft, and Bradley K. Yoder. The Primary Cilium as a Complex Signaling Center. *Current Biology*, 19(13) :R526–R535, jul 2009. 40
- [16] S. M. Ware, M. G. Aygun, and F. Hildebrandt. Spectrum of Clinical Diseases Caused By Disorders of Primary Cilia. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(5) :444–450, sep 2011. 40
- [17] A Hilfinger and F Jülicher. The chirality of ciliary beats. *Physical Biology*, 5(1) :016003, mar 2008. 40

- [18] Hiroshi Hamada and Patrick P.L. Tam. Mechanisms of left-right asymmetry and patterning : driver, mediator and responder. *F1000Prime Reports*, 6 :110, dec 2014. [40](#), [41](#)
- [19] A. G. Kramer-Zucker, Felix Olale, Courtney J Haycraft, Bradley K Yoder, Alexander F Schier, and Iain A Drummond. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development*, 132(8) :1907–1921, apr 2005. [40](#), [45](#)
- [20] Tetsuya Nakamura, Naoki Mine, Etsushi Nakaguchi, Atsushi Mochizuki, Masamichi Yamamoto, Kenta Yashiro, Chikara Meno, and Hiroshi Hamada. Generation of Robust Left-Right Asymmetry in the Mouse Embryo Requires a Self-Enhancement and Lateral-Inhibition System. *Developmental Cell*, 11(4) :495–504, oct 2006. [40](#)
- [21] M Levin, R L Johnson, C D Stern, M Kuehn, and C Tabin. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*, 82(5) :803–14, sep 1995. [41](#)
- [22] Michael Levin. Left–right asymmetry in embryonic development : a comprehensive review. *Mechanisms of Development*, 122(1) :3–25, jan 2005. [41](#)
- [23] Martin Blum and Tim Ott. Animal left–right asymmetry. *Current Biology*, 28(7) :R301–R304, apr 2018. [41](#), [43](#)
- [24] Hidetaka Shiratori and Hiroshi Hamada. The left-right axis in the mouse : from origin to morphology. *Development (Cambridge, England)*, 133(11) :2095–104, jun 2006. [41](#), [43](#)
- [25] Jeffrey D. Amack. Salient features of the ciliated organ of asymmetry. *BioArchitecture*, 4(1) :6–15, jan 2014. [43](#)
- [26] Jeffrey J Essner, Jeffrey D Amack, Molly K Nyholm, Erin B Harris, and H Joseph Yost. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development (Cambridge, England)*, 132(6) :1247–60, mar 2005. [43](#)
- [27] Rita R Ferreira, Andrej Vilfan, Frank Jülicher, Willy Supatto, and Julien Vermot. Physical limits of flow sensing in the left-right organizer. *eLife*, 6, jun 2017. [43](#), [61](#), [63](#), [65](#), [74](#)
- [28] Charles B. Kimmel, William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, and Thomas F. Schilling. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3) :253–310, jul 1995. [44](#)
- [29] Willy Supatto, Scott E Fraser, and Julien Vermot. An All-Optical Approach for Probing Microscopic Flows in Living Embryos. [44](#), [46](#)
- [30] Jason J Gokey, Yongchang Ji, Hwee Goon Tay, Bridget Litts, and Jeffrey D Amack. Kupffer's vesicle size threshold for robust left-right patterning of the zebrafish embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 245(1) :22–33, jan 2016. [44](#)
- [31] Rita R Ferreira, Guillaume Pakula, Anna Klaeyle, Hajime Fukui, Andrej Vilfan, Willy Supatto, Julien Vermot, and Lhé Anna Klaeyle. Chiral Cilia Orientation in the Left-Right Organizer. *Cell Reports*, 25, 2018. [44](#), [72](#), [74](#), [75](#), [78](#), [79](#), [80](#), [81](#), [82](#), [86](#)

- [32] G. G. Stokes and G. G. On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society, Vol. 9, p.8, 9 :8,* 1851. [44](#)
- [33] Julyan H E Cartwright, Oreste Piro, and Idan Tuval. Fluid dynamics in developmental biology : moving fluids that shape ontogeny. *HFSP journal, 3(2) :77–93,* 2009. [44](#)
- [34] E M Purcell. The efficiency of propulsion by a rotating flagellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(21) :11307–11,* oct 1997.
- [35] E. M. Purcell. Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics, 45(1) :3–11,* jan 1977. [45](#)
- [36] Andrej Vilfan and Frank Jülicher. Hydrodynamic Flow Patterns and Synchronization of Beating Cilia. *Physical Review Letters, 96(5) :058102,* feb 2006. [44](#), [46](#)
- [37] Willy Supatto and Julien Vermot. From Cilia Hydrodynamics to Zebrafish Embryonic Development. *Current Topics in Developmental Biology, 95 :33–66,* jan 2011. [44](#), [45](#)
- [38] Y. Hirota, A. Meunier, S. Huang, T. Shimozawa, O. Yamada, Y. S. Kida, M. Inoue, T. Ito, H. Kato, M. Sakaguchi, T. Sunabori, M.-a. Nakaya, S. Nonaka, T. Ogura, H. Higuchi, H. Okano, N. Spassky, and K. Sawamoto. Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. *Development, 137(18) :3037–3046,* sep 2010. [45](#)
- [39] Julyan H E Cartwright, Oreste Piro, and Idan Tuval. Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(19) :7234–9,* may 2004. [45](#), [46](#)
- [40] Yasushi Okada, Sen Takeda, Yosuke Tanaka, Juan-Carlos Izpisua Belmonte, and Nobutaka Hirokawa. Mechanism of Nodal Flow : A Conserved Symmetry Breaking Event in Left-Right Axis Determination. *Cell, 121(4) :633–644,* may 2005. [46](#)
- [41] Willy Supatto, Scott E. Fraser, and Julien Vermot. An All-Optical Approach for Probing Microscopic Flows in Living Embryos. *Biophysical Journal, 95(4) :L29–L31,* aug 2008. [47](#), [48](#)
- [42] Rita R. Ferreira and Julien Vermot. The balancing roles of mechanical forces during left-right patterning and asymmetric morphogenesis. *Mechanisms of Development, 144 :71–80,* apr 2017. [50](#)
- [43] Antonia Borovina, Simone Superina, Daniel Voskas, and Brian Ciruna. Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nature Cell Biology, 12(4) :407–412,* apr 2010. [52](#)
- [44] Gerlind Herberich, Reinhard Windoffer, Rudolf E. Leube, and Til Aach. Signal and Noise Modeling in Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy. pages 381–388. 2012. [58](#)
- [45] N. I. Fisher, Toby. Lewis, and B. J. J. (Brian J. J.) Embleton. *Statistical analysis of spherical data.* Cambridge University Press, 1993. [67](#)
- [46] Tim Hesterberg. Bootstrap Methods and Permutation Tests. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Statistics, 3(6) :497–526,* nov 2011. [76](#)

- [47] Jessica Sullivan-Brown, Jodi Schottenfeld, Noriko Okabe, Christine L. Hostetter, Fabrizio C. Serluca, Stephan Y. Thiberge, and Rebecca D. Burdine. Zebrafish mutations affecting cilia motility share similar cystic phenotypes and suggest a mechanism of cyst formation that differs from *pkd2* morphants. *Developmental Biology*, 314(2) :261–275, feb 2008. [78](#)
- [48] Thomas Juan, Charles Géminard, Jean-Baptiste Coutelis, Delphine Cerezo, Sophie Polès, Stéphane Noselli, and Maximilian Fürthauer. Myosin1D is an evolutionarily conserved regulator of animal left–right asymmetry. *Nature Communications*, 9(1) :1942, dec 2018. [80](#)
- [49] F. Xing and L. Yang. Machine learning and its application in microscopic image analysis. *Machine Learning and Medical Imaging*, pages 97–127, jan 2016. [84](#)
- [50] P. Pintado, P. Sampaio, B. Tavares, T. D. Montenegro-Johnson, D. J. Smith, and S. S. Lopes. Dynamics of cilia length in left–right development. *Royal Society Open Science*, 4(3) :161102, mar 2017. [86](#)
- [51] Guillaume Pakula. 3D-CiliaMap : 3D Cilia Feature Quantification - Experimental. *In preparation*. [87](#)





# Chapitre 3

## Résoudre le cycle cardiaque in vivo

■ *Il n'existe que deux choses infinies, l'univers et la vitesse d'acquisition atteignable par la méthode XTYZ... mais pour l'univers, je n'ai pas de certitude absolue.* ■

---

Albert Einstein

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>94</b>
3.1.1	Structure du muscle cardiaque et source de signal SHG	94
3.1.2	Limites des l'imagerie à fluorescence et SHG des muscles	100
3.1.3	Déclenchement prospectif, rétrospectif	105
<b>3.2</b>	<b>Exploiter la périodicité pour imager plus vite</b>	<b>109</b>
3.2.1	Stratégie et objectifs de l'imagerie XTYZ	109
3.2.2	Dispositif d'acquisitions XTYZ avec signal de référence	114
3.2.3	Paramètres d'acquisition	123
3.2.4	Implémentation de la reconstruction XTY	132
<b>3.3</b>	<b>Résultats</b>	<b>145</b>
3.3.1	Performances d'imagerie	145
3.3.2	Une reconstruction XTYZ exacte et précise	147
3.3.3	Robustesse aux apériodicités	153
3.3.4	Débruitage par repliement de cycles : phototoxicité et signaux faibles	158
3.3.5	Suivi dynamique des sarcomères au cours de la contraction cardiaque par microscopie SHG	163
3.3.6	Imagerie multimodale	170
3.3.7	Imagerie d'un autre modèle : l'embryon de poulet	174
<b>3.4</b>	<b>Perspectives</b>	<b>180</b>
3.4.1	Amélioration de la reconstruction XTYZ	180
3.4.2	Imagerie SHG du cœur	184
3.4.3	Imagerie calcique	187
3.4.4	Systèmes périodiques ou stimulables	187
<b>3.5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>190</b>
<b>3.6</b>	<b>Références</b>	<b>190</b>

---

### 3.1 Introduction

L'étude de la morphogénèse et de la dynamique du coeur embryonnaire demeure un sujet actif de recherche en biologie du développement. Comme évoqué dans le chapitre introductif, la dynamique du mouvement cardiaque se situe à la limite de ce que les techniques d'imagerie optique tridimensionnelle de pointe sont capables de résoudre, à la fois dans l'espace que dans le temps. En effet, pour de nombreuses applications, il serait utile de pouvoir suivre *in vivo* et avec une résolution sub-cellulaire (ou micrométrique), des structures se déplaçant à plus d'un millimètre par seconde ; c'est notamment le cas des valves ou des fibres musculaires dans un coeur d'embryon de poisson-zèbre. Pour éviter les artefacts, à l'exemple du flou cinétique, il est alors nécessaire d'imager le coeur en 3D avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde (c'est-à-dire à 1000 volumes par seconde). Ces échelles ne sont alors pas accessibles en microscopie de fluorescence 1-photon ni 2-photon, même avec les développements les plus récents.

De plus, nous nous sommes en particulier intéressés au cas de l'imagerie sans-marquage de génération de seconde harmonique (SHG). Cette approche permet d'obtenir un contraste spécifique des fibres musculaires du coeur avec une résolution tridimensionnelle, et en profondeur dans les tissus. Elle présente de nombreux avantages à l'imagerie cardiaque, en particulier celui de ne nécessiter aucun marquage et de pouvoir être associée à la fluorescence. Toutefois, la technique souffre d'une vitesse d'acquisition encore plus limitée qu'en imagerie à fluorescence, ces signaux étant en général de plus faible intensité.

Dans ce contexte, nous proposons d'exploiter la nature périodique des mouvements des tissus cardiaques afin de contourner les limitations classiques de vitesse d'imagerie, en microscopie multiphoton de fluorescence et de génération d'harmoniques. En utilisant cette propriété, nous avons développé une stratégie originale d'acquisition et de reconstruction d'image, désignée dans la suite comme **imagerie XTYZ**, basée sur la synchronisation d'acquisitions en lignes. Nous avons pour objectif de résoudre le battement cardiaque *in vivo* avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde (1000 volumes par seconde). En microscopie de fluorescence excitée à deux photons ou de génération de seconde harmonique (SHG), l'objectif est alors d'améliorer la vitesse d'imagerie sans pour autant dégrader la résolution spatiale intrinsèque de ces techniques. Cette approche nous permettra de capturer les mouvements les plus rapides des cellules de l'endocarde pendant l'ouverture et la fermeture des valves, ou encore la contraction des sarcomères des muscles cardiaques avec une résolution spatiale et temporelle sans précédent.

Dans cette section, après avoir rappelé la structure des muscles cardiaques et l'origine du contraste SHG (section 3.1.1), nous discuterons les limites actuelles de la microscopie multiphoton des muscles *in vivo* (section 3.1.2). Finalement, nous présenterons les techniques actuelles d'imagerie par déclenchement prospectif et rétrospectif utilisées en imagerie cardiaque *in vivo* (section 3.1.3.3).

#### 3.1.1 Structure du muscle cardiaque et source de signal SHG

Bien que le coeur du poisson-zèbre soit un modèle plus simple que le coeur humain, son étude n'en demeure pas moins biologiquement pertinente [1]. Ce système modèle présente de nombreux avantages pour l'étude de la morphogénèse et du développement cardiaque. En effet, au cours du développement, le coeur de poisson-zèbre est suffisamment petit et simple peut-être imagé en entier en microscopie optique. De manière générale, il devient un modèle reconnu de pathologies cardiaques [2] de même que pour l'étude de l'électrophysiologie cardiaque [3] chez les vertébrés. Le poisson-zèbre est également un modèle unique d'étude de la morphogénèse et de la régénération cardiaque : il présente un fort potentiel de régénération, et

permet de manière concomitante l'imagerie *in vivo* et la manipulation génétique [4]. Du point de vue structurel, le cœur humain comporte quatre chambres alors que celui du poisson-zèbre n'en dispose que de deux : l'atrium et le ventricule. Chez cet organisme, il se trouve entre la tête et le tronc et demeure assez éloigné du reste du corps du poisson durant les stades précoces de développement. Cette configuration, illustrée figure 3.1, présente un dernier avantage de taille à l'imagerie de cet organe : il est très accessible à l'imagerie optique.

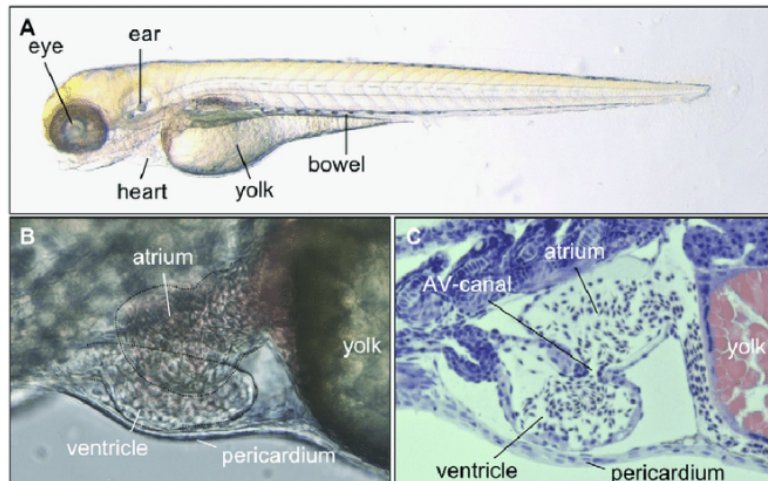


FIGURE 3.1: Système vasculaire de l'embryon de poisson-zèbre à 72 hpf de développement. Tiré de [5].

Ses deux chambres sont connectées par le canal atrio-ventriculaire, mais séparées par une valve qui s'ouvre ponctuellement pour laisser passer le flux sanguin d'une cavité à l'autre (en vert dans la figure 3.2). Lors de la diastole atriale, le sang pénètre dans l'atrium ainsi relâché, puis est éjecté en direction du ventricule par contraction de l'atrium lors de la systole atriale. Pour terminer le cycle, le sang est finalement expulsé par la valve d'éjection vers l'aorte ventrale et le reste du système vasculaire. Aux stades embryonnaires, le cœur de poisson-zèbre est composée de deux principales couches cellulaires : à l'intérieur l'endocarde, et l'extérieur le myocarde. Elles sont entourées par le péricarde, une double couche entourant les deux précédentes et permettant de fixer le cœur au thorax aussi bien que de le protéger des infections (figure 3.1).

**Développement du cœur** Au cours des 5 premiers jours de développement, le cœur de poisson-zèbre évolue rapidement. À 5 heures de développement (hpf pour hours post-fertilization), le cœur précoce se présente sous la forme de cellules progénitrices, qui se muent en un tube linéaire battant après seulement 24 heures. Après 36 heures, le cœur est déjà constitué de ses deux chambres caractéristiques et se positionne entre la tête et le tronc du poisson. Au cours des deux jours qui suivent, les deux chambres se différencient d'avantage et le cœur se place de manière plus saillante vers l'extérieur. Le ventricule se trouve alors du côté droit, et l'atrium du côté gauche du poisson ; tous les deux approximativement au même plan relativement à l'axe dorso-ventral. Une chronologie du développement du cœur entre 5 hpf et 5 dpf est présentée figure 3.2.

**Du muscle cardiaque au sarcomère individuel** Les tissus musculaires peuvent être séparés en trois groupes distincts : les muscles squelettiques, les muscles lisses, et le muscle cardiaque. Ils sont illustrés figure 3.3 et présentent les caractéristiques suivantes :

- Les muscles squelettiques, correspondant aux muscles dont la contraction est volontaire ; ils présentent une structure striée, sont attachés aux os par des tendons et permettent les mouvements, le maintien de la posture ou encore la locomotion. Ils composent près

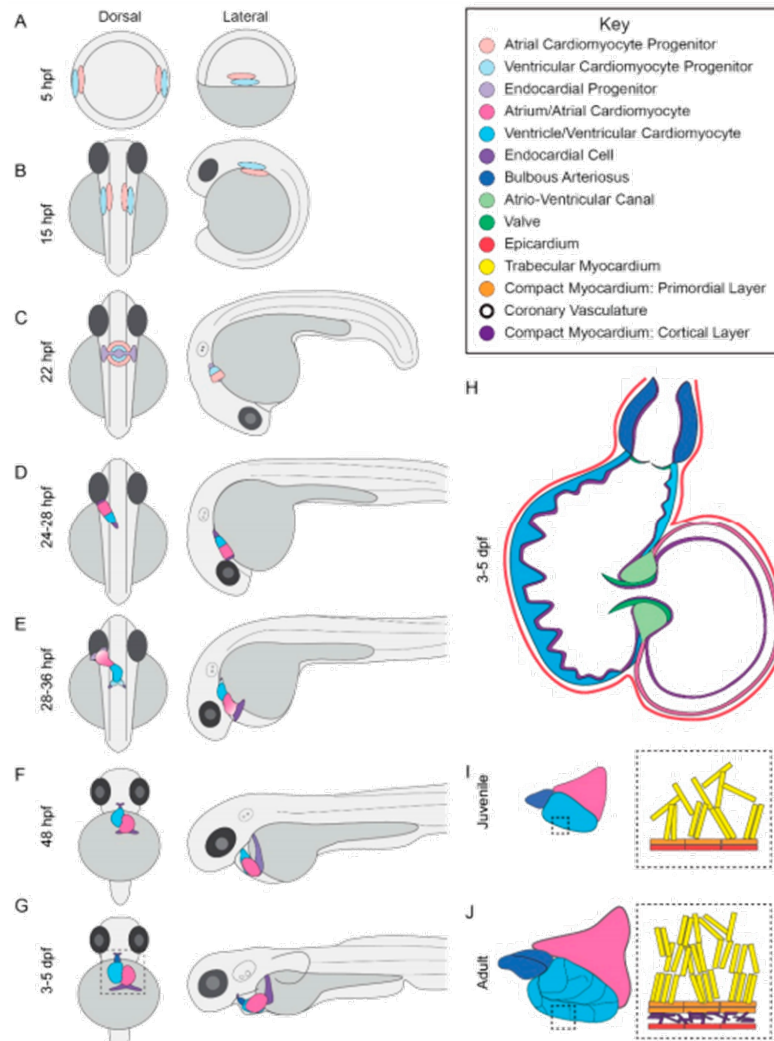


FIGURE 3.2: Développement du cœur de poisson-zèbre au cours des 5 premiers jours. Tiré de [6].

de la moitié de la masse totale d'un homme, et un tiers de celle d'une femme. Ce type de muscle est dit strié, en raison de leur apparence discontinue sous le microscope.

- Les muscles lisses, qui constituent les parois des organes tels que l'œsophage, l'estomac ou les intestins. Leur contrôle n'est pas volontaire. Ils ne présentent pas de structure en stries et sont, comme leur nom le suggère, d'aspect lisse.
- Le muscle cardiaque, qu'on retrouve uniquement dans le cœur. Sa structure striée est semblable à celle du muscle squelettique, mais sa contraction est involontaire et régie par le système nerveux autonome. Les cellules qui le constituent sont les cardiomyocytes.

Ainsi, le cœur est avant tout un muscle, mais dont la contraction est cependant involontaire. Il partage beaucoup de similitudes avec les muscles squelettiques, en particulier cette structure striée qui fait leur spécificité. La figure 3.4 expose alors la structure d'un muscle squelettique, du muscle entier jusqu'à son unité constitutive élémentaire, le sarcomère. Chaque muscle squelettique est alors composé d'une multitude de fibres musculaires, elles-mêmes composées de plusieurs myofibrilles. Une myofibrille est constituée à son tour de multiple myofilaments. Finalement, ces myofilaments sont formés par les unités contractiles de base du muscle, mises bout à bout ; cette unité élémentaire s'appelle **le sarcomère**. Lors d'une impulsion nerveuse, ces sarcomères sont capables de se contracter, résultant en un rétrécissement de leur longueur. Le raccourcissement conjoint des sarcomères ainsi joints permet

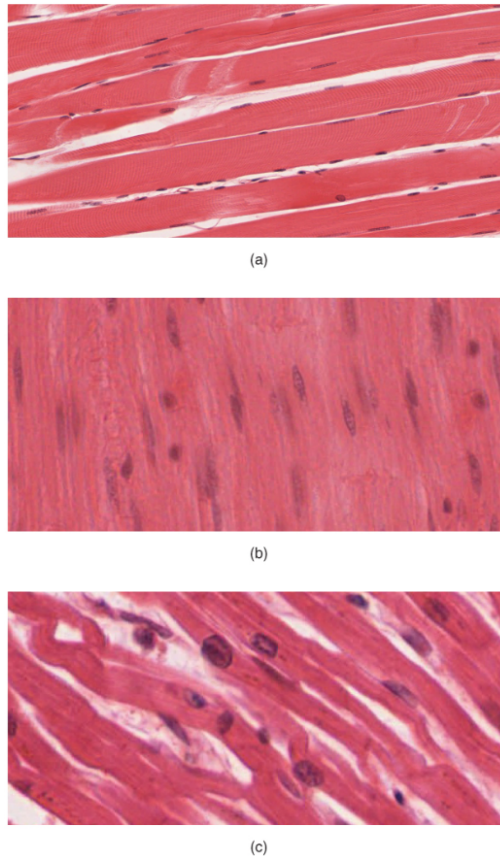


FIGURE 3.3: Aspect visuel des différents types de muscles. (a) Muscle squelettique, d'aspect strié. (b) Muscle lisse, d'aspect lisse. (c) Muscle cardiaque, lui aussi d'aspect strié. Tiré de Wikipedia.

un raccourcissement du muscle entier : c'est la contraction du muscle. Le fonctionnement et la structure des muscles cardiaques (myocarde) sont très similaires. Les fibres musculaires sont contenues dans les cardiomyocytes, qui sont les cellules constitutives du tissu musculaire cardiaque. Ne comportant qu'un unique noyau, ces cellules se distinguent cependant des cellules polynucléées constitutives des muscles squelettiques, issues de la fusion de plusieurs cellules musculaires.

**Le sarcomère** Le sarcomère est donc l'unité fondamentale de la contraction musculaire. Sa structure est détaillée par le schéma en figure 3.5. Il est principalement composé de deux types de filaments : des filaments d'actine, dit filaments minces, entre lesquels s'insèrent des filaments de myosine, ou filaments épais. Le sarcomère est délimité de part et d'autre par la ligne Z, par lesquels ils sont interconnectés. La séparation médiane du sarcomère est appelée la ligne M. La contraction du sarcomère individuel se déroule comme suit [7; 8] : à l'état relâché le sarcomère s'étend de toute sa longueur et le filament de myosine est maintenu au disque Z par un troisième type de filament, composé de titine. Lorsqu'une impulsion électrique est envoyée par le système nerveux, le filament de myosine va alors glisser le long du filament d'actine. En progressant le long de celui-ci, le filament de myosine tire sur chaque extrémité du sarcomère, raccourcissant la bande I, rapprochant ainsi les lignes Z et résultant en une contraction de la longueur totale du sarcomère. La taille du sarcomère varie largement d'un modèle à l'autre [9], de même qu'au sein des différents muscles d'un même individu [10]. Moo et al. [11] ont par ailleurs prouvé qu'il existait des disparités de longueur de sarcomères au sein d'un même muscle, dépendamment de la zone étudiée. Cependant, les valeurs de longueur du sarcomère relâché se trouvent typiquement entre 2 et 2.5  $\mu\text{m}$ . Un récapitulatif de la variabilité

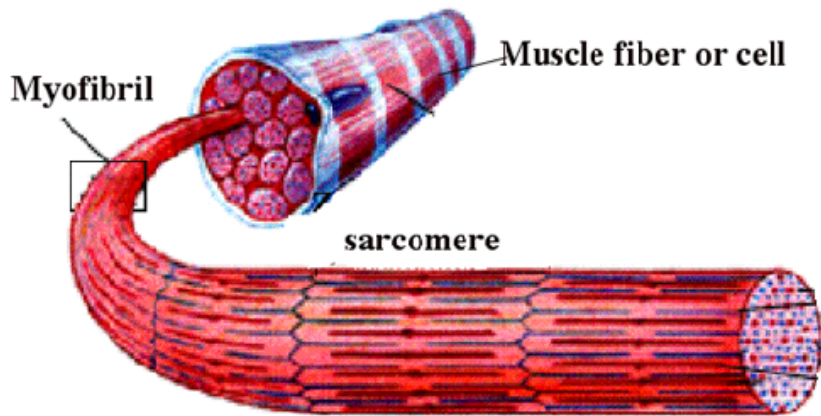


FIGURE 3.4: Schéma de la décomposition d'un muscle squelettique.

des tailles de sarcomère entre espèces est exposé au tableau 3.6.

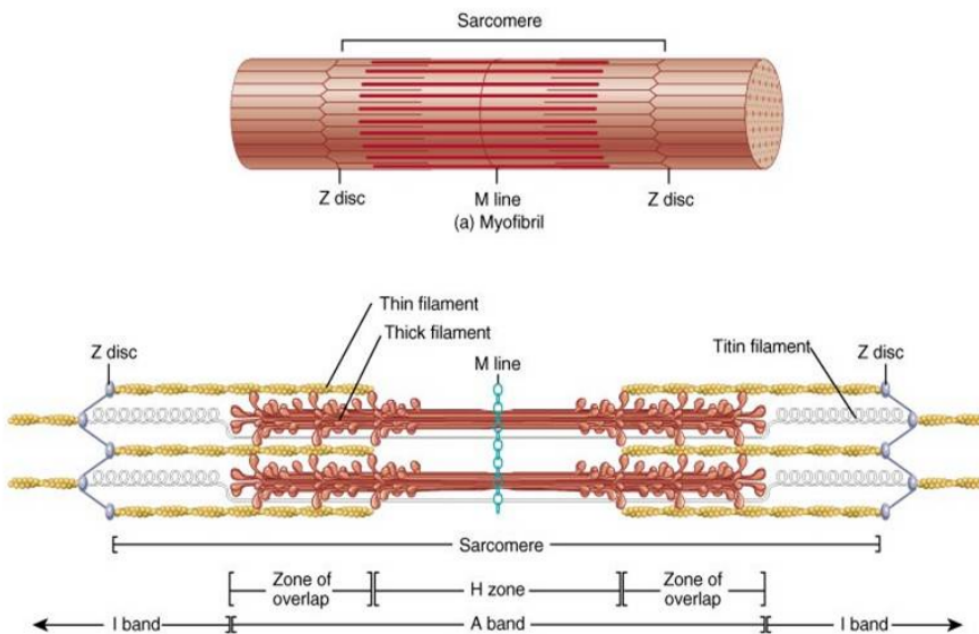


FIGURE 3.5: Schéma de la structure et du fonctionnement d'un sarcomère.

**Le sarcomère comme source de contraste SHG** Comme il a été présenté dans le chapitre introductif, le signal de SHG est généré de manière cohérente à partir de l'illumination de structures non centro-symétriques. En d'autres termes, cela signifie que lorsqu'on illumine une structure très organisée avec un faisceau laser intense, un photon cohérent peut émerger de l'interaction simultanée de deux photons incidents. Le signal SHG est alors un moyen de révéler à l'imagerie ces structures organisées, qui sont nombreuses dans les organismes vivants [12–14]. Les sources principales de contraste SHG endogène dans les tissus biologiques sont les fibres de collagène et les fibres de muscles striés.

Species	Thick filament length ( $\mu\text{m}$ )	Thin filament length ( $\mu\text{m}$ )	Optimal sarcomere length, $L_0$ ( $\mu\text{m}$ )
Carp	1.51	0.98	2.11
Cat	1.60*	1.12	2.43
Chicken	1.60	0.95	2.08
Frog	1.60	0.98	2.08
Human	1.60	1.27	2.64
Hummingbird	1.47	1.75	1.98
Monkey	1.60*	1.16	2.41
Rabbit	1.60*	1.09	2.27
Rat	1.60*	1.11	2.4
Wild rabbit	1.60	1.12	2.27

FIGURE 3.6: Tableau des variabilités de longueur de sarcomère entre espèces. Tiré de [9].

Ainsi, la myosine des sarcomères a été identifiée comme une forte source endogène de signal SHG dans les muscles [14; 16]. En effet, au sein du sarcomère, le filament épais est composé d'un polymère de myosine [15], constitué de multiples têtes alignées qui permettent la liaison avec l'actine, comme visibles figure 3.7. Les sarcomères, et plus spécifiquement les filaments épais, sont alors scindés symétriquement en deux régions directionnelles, dans lesquelles l'orientation générale des myosines est opposée. À cette échelle micrométrique, on observe alors une conformation très organisée des filaments de myosine du sarcomère, en particulier leur queue. C'est cette organisation non centro-symétrique à l'échelle du volume focal qui génère un signal SHG détectable en microscopie multiphoton. Ainsi, Plotnikov et al. [16] ont identifié expérimentalement l'organisation dense des queues de myosine comme étant la source du fort signal SHG émanant des muscles. La figure 3.8 présente la forme caractéristique d'une image SHG d'un sarcomère de cardiomyocyte de grenouille *ex vivo*. En intensité, le profil d'un sarcomère est en forme de "M". Ceci est dû à l'organisation directionnelle des filaments, qui se joignent au niveau de la ligne M. Cette zone devient alors centro-symétrique à l'échelle du volume focal à la jonction des deux fibres de direction opposées : on y collecte alors moins de signal. C'est ce que l'on observe sur la figure 3.5 : le signal est plus faible au niveau de la ligne M, et encore moins aux abords de la ligne Z (bande I plus sombre). Notons que nous n'observons pas de signaux SHG provenant des muscles lisses car les myosines n'y présentent pas d'organisation non centro-symétrique à l'échelle du volume focal.

**SHG ou fluorescence pour imager les muscles cardiaques ?** De manière analogue à la microscopie SHG, les sarcomères peuvent aussi être révélés et imagés en profondeur dans les tissus biologiques en microscopie de fluorescence, au moyen de fluorophores spécifiquement attachés à l'actine ou à la myosine [18]. La SHG présente cependant un certain nombre d'avantages sur la fluorescence. Parmi ceux-ci, le signal SHG ne souffre d'aucun photoblanchiment et ne nécessite pas de marquage exogène. Par ailleurs, la SHG présente une grande spécificité de la myosine sarcomérique, puisque le signal provient de sa structure interne. À l'inverse, il est difficile de marquer la myosine et l'actine spécifiques du sarcomère à l'aide de fluorophores.

Il est à noter qu'il existe de fortes différences entre l'imagerie à fluorescence et SHG des sarcomères, en particulier pour ceux provenant du muscle cardiaque. D'abord, à l'inverse du signal de fluorescence, le signal SHG est très directionnel [19]. Comme le présente la figure 1.15 du chapitre introductif, l'essentiel des photons cohérents détectés en SHG le sont



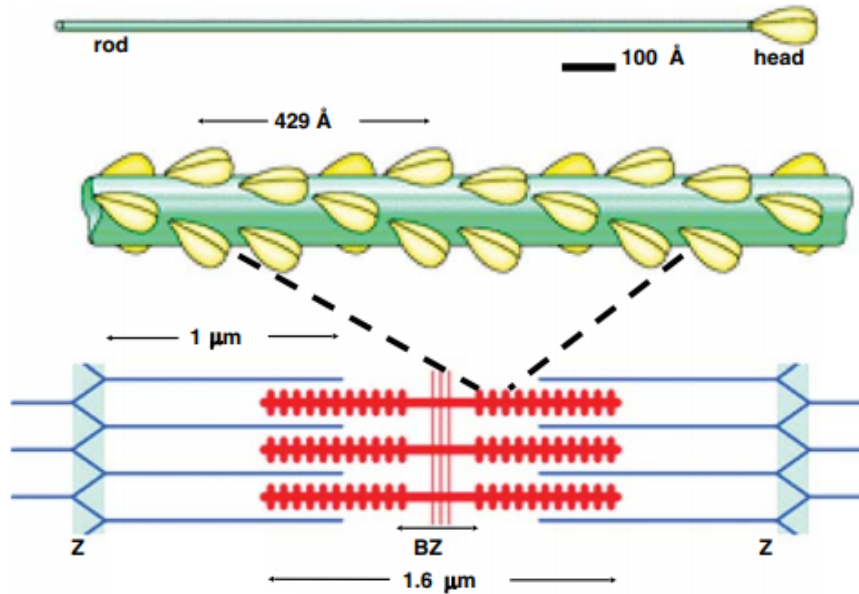


FIGURE 3.7: Schéma de la structure des filaments épais composés d'un polymère de myosine. Un filament épais est composé de plusieurs centaines de molécules de myosine. Leurs têtes sont disposées de manière hélicoïdale et espacées régulièrement autour du filament pour permettre le contact avec les filaments d'actine. Les têtes de myosines sont au sein d'un filament, toutes orientées dans la même direction. Tiré de [15].

dans la direction avant ou arrière, parallèlement à l'axe d'illumination. Le profil directionnel de radiation est alors conditionné par la distribution et l'orientation des dipôles au volume focal, et par extension par la nature moléculaire de la structure imagée. Pour le collagène, la directionnalité et le rapport avant/arrière du signal SHG ont été caractérisés [20–22]. Le signal SHG provenant des muscles s'avère plus fortement directionnel encore, le signal étant pour l'essentiel détecté dans la direction avant [16; 23]. Ainsi, contrairement au cas de la fluorescence, la seule géométrie efficace en imagerie SHG des sarcomères est la géométrie colinéaire. Il a été démontré dans notre laboratoire que la géométrie orthogonale utilisée en microscopie à nappe de lumière n'est pas efficace pour collecter les signaux SHG provenant des muscles striés (travaux non publiés de Guy Malkinson), même si des signaux très faibles de SHG du collagène ont été obtenus auparavant à l'aide de cette technique [24]. Il n'est donc pas possible de tirer profit de la microscopie à nappe de lumière pour imager rapidement les signaux SHG des muscles cardiaques et donc nécessaire de développer une méthode rapide, en géométrie colinéaire (imagerie point par point). Enfin, comme nous le verrons plus tard, les signaux SHG provenant des muscles cardiaques sont en général beaucoup plus faibles que dans les muscles squelettiques. Cette différence est probablement due à une plus faible densité, ou une plus faible organisation des myosines sarcomériques dans les muscles cardiaques. Elle explique sans doute qu'il n'existe que très peu de travaux rapportant l'imagerie SHG dans ces derniers, comme nous le verrons dans la section suivante. Ainsi, à ce jour et à notre connaissance, seule la fluorescence a été utilisée pour imager la dynamique des sarcomères *ex vivo* dans le coeur de poisson-zèbre [18].

### 3.1.2 Limites des l'imagerie à fluorescence et SHG des muscles

Dans cette section, nous proposons tout d'abord de mettre en évidence les limites actuelles de la microscopie de fluorescence pour l'imagerie rapide du coeur. Puis, nous présenterons les cas de l'imagerie SHG des muscles.

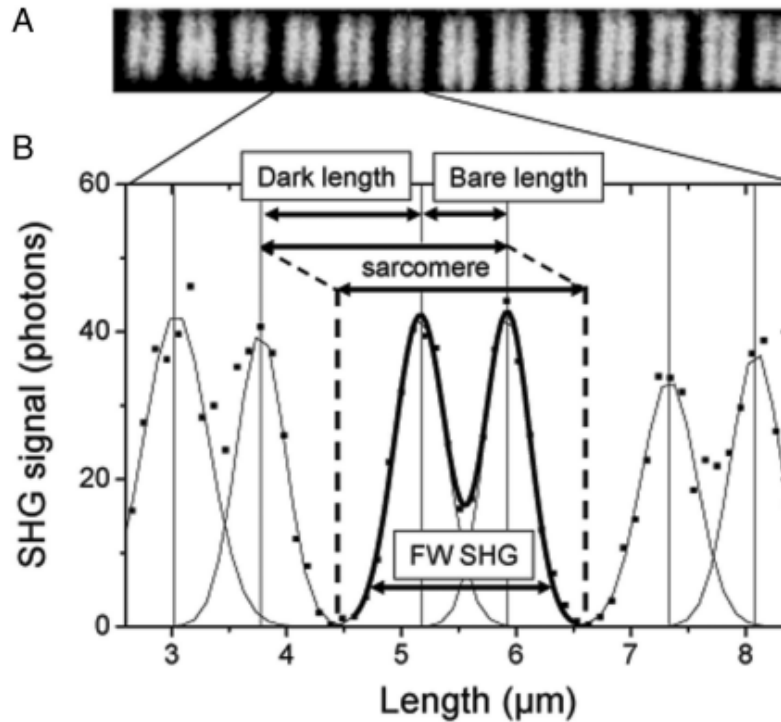


FIGURE 3.8: Forme caractéristique d'un sarcomère en contraste SHG. En d'intensité, on observe un profil très caractéristique en forme de "M". Cela correspond à la structure interne du sarcomère, et de son filament épais de myosine directionnel, dont la polarisation des filaments est orientée dans des directions opposées par rapport à la ligne M. Tiré de [17].

**Microscopie de fluorescence rapide pour imager le cœur *in vivo*** La vitesse d'imagerie en microscopie de fluorescence est un enjeu majeur [25]. Depuis une quinzaine d'années, notamment avec l'essor de la microscopie à nappe de lumière (*Light-sheet microscopy*) [26; 27], la vitesse d'acquisition a considérablement été améliorée. Naturellement, l'imagerie cardiaque a directement profité de ces avancées, ainsi que de nouvelles approches de traitement des images. Par exemple, profitant de la caractéristique périodique du cœur, Liebling et al. [28] ont développé une stratégie de reconstruction de plans 2D en volume 3D à haute vitesse. La reconstruction à partir d'images obtenues en microscopie confocale rapide, permet alors d'obtenir une résolution temporelle d'environ 100 volumes par seconde sur de petits champs de vue (256x256x20 pixels). En 2008, Scherz et al. [29] proposent l'étude de la morphogenèse des valves atrio-ventriculaires à l'aide d'acquisitions de plans rapides en microscopie à nappe de lumière. Dépendamment du champ de vue à nouveau, les acquisitions dynamiques (xyt) obtenues pouvaient atteindre entre 70 et 160 images par seconde. De ceci, ont commencé à émerger des techniques volumiques rapides, par la reconstruction a posteriori d'image 3D par acquisition rapides de plans 2D, en nappe de lumière cette fois. C'est notamment le cas de Mahou et al. [30] et de leur reconstruction du cœur battant en fluorescence multicolore, à des vitesses de l'ordre de 50 à 80 volumes par seconde. Par ailleurs, Mickoleit et al. [31] proposent en 2014 de pousser les limites de la technique, en permettant la reconstruction d'un volume entier à des vitesses allant de 300 à 500 volumes par seconde. La reconstruction présentée figure 3.9 est alors composée d'une superposition d'environ 200 images 2D dynamiques synchronisées entre-elles. Malgré les avancées observées en vitesse d'imagerie et dans tous les cas présentés ici, la vitesse d'acquisition n'atteint cependant jamais les 1000 volumes par seconde nécessaires à la capture des structures les plus dynamiques du cœur.

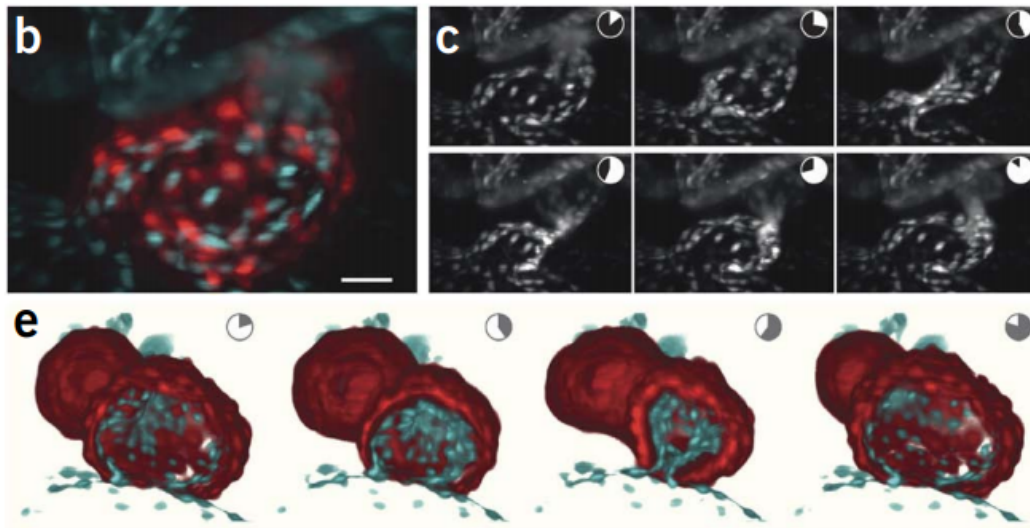


FIGURE 3.9: Reconstruction haute-vitesse d'un cœur battant de poisson-zèbre. (b) représente une projection en maximum d'intensité de la reconstruction. (c) représente l'endocarde à différentes phases du cycle de contraction. (e) représente le rendu 3D de la reconstruction volumique de l'atrium. Tiré de [31].

**Microscopie SHG des muscles** Avant toute chose, il est utile de souligner que la majorité des études des muscles en microscopie SHG ont été conduites sur des muscles squelettiques, en configuration *ex vivo*, *in vivo* ou sur cellules de cardiomyocytes en culture *in vitro*. Par ailleurs, la plupart de ces études ont porté sur des fibres musculaires statiques, ne nécessitant ainsi pas d'imagerie dynamique. Finalement, à notre connaissance, aucune étude n'a jamais démontré l'utilisation de la microscopie SHG pour l'imagerie du muscle cardiaque dynamique, en particulier *in vivo*.

**Microscopie SHG statique des muscles** En effet, l'essentiel des analyses quantitatives des muscles statiques ont été réalisées sur les muscles squelettiques ; ceux-ci présentent un signal SHG fort, sont accessibles et composent l'essentiel du tissu musculaire chez la plupart des organismes. Les études sont alors nombreuses et proposent d'estimer la longueur des sarcomères chez les différents organismes et les différents muscles. La plupart des études en SHG sont obtenues *ex vivo* [16; 32], mais les études statiques sur muscles squelettiques se font également *in vivo* [11; 13; 33]. Celles-ci ont permis notamment d'établir avec précision l'origine du signal SHG dans les muscles, ainsi que de l'appliquer à l'étude des tissus cardiaques.

Un certain nombre d'études ont porté sur les tissus cardiaques, mais principalement sur les cardiomyocytes isolés. Boulesteix et al. [17] ont alors caractérisé la source du signal SHG et repéré la forme caractéristique en M du profil d'intensité des sarcomères cardiaques, sur des cardiomyocytes isolés de grenouille. D'autres études ont proposé d'étudier la myofibrillogenèse [20], ou encore les cardiomyocytes isolés de fœtus de moutons [35], par contraste SHG. On peut également citer l'étude de Chiu et al. [34], pour laquelle l'imagerie SHG a été utilisée sur des échantillons de myocytes humains provenant de l'atrium. Il est intéressant de noter que le signal SHG n'a révélé que peu de signal provenant des fibres musculaires, alors qu'il permet de distinguer aisément un fort signal émanant du collagène (figure 3.10). Ce résultat est à mettre en perspective avec la discussion de directionnalité du signal SHG précédemment évoquée : le montage expérimental proposait ici une collection du signal en épi-détection.

En début de ce projet, nous avons utilisé un microscope optimisé pour les signaux SHG afin

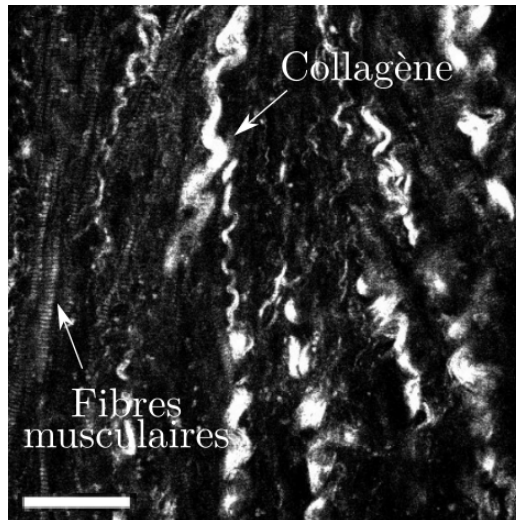


FIGURE 3.10: Imagerie SHG d'un échantillon de cœur humain adulte sain. On distingue la marque caractéristique du collagène, alors qu'on ne distingue que faiblement le signal provenant des fibres musculaires. Barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ . Tiré de [34].

d'imager le cœur de poisson-zèbre arrêté *in vivo*. Comme le montre la figure 3.49, ces images 3D révèlent notamment un signal SHG très intense provenant des muscles squelettiques et un signal beaucoup plus faible provenant des fibres enchevêtrées du muscle cardiaque (ventricule au centre de l'image). Le niveau signal détecté demeurerait cependant raisonnable et surtout très prometteur. Cependant, à ce moment du projet, la vitesse d'imagerie du microscope n'était pas suffisante pour envisager une imagerie dynamique du cœur battant.

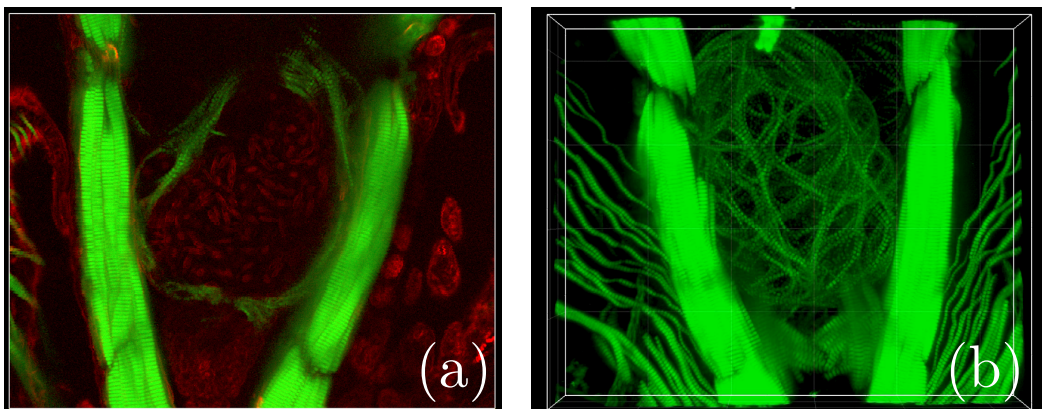


FIGURE 3.11: Imagerie SHG/THG 3D du cœur de poisson-zèbre arrêté *in vivo*. (a) Plan 2D extrait du volume. En vert le signal SHG révélant les muscles. En rouge, le signal THG caractéristique des interfaces, avec notamment un signal provenant des cellules sanguines. (b) Image 3D des muscles cardiaques du ventricule (au centre) entouré des muscles squelettiques de la mâchoire. Image acquise par Guy Malkinson au Laboratoire d'Optique et Biosciences.

**Vers la microscopie SHG dynamique des muscles** Non seulement les fibres musculaires striées du muscle cardiaque se déplacent rapidement, mais elles produisent moins de signal que les muscles squelettiques. La raison de ce signal moins intense n'est cependant pas documentée : il peut avoir pour origine une densité plus faible de myosines dans les sarcomères cardiaque, une organisation spatiale moins importante ou une structure de la myosine

cardiaque différente des celle des muscles squelettiques. À ce jour, et à notre connaissance, aucune étude n'a été conduite en SHG dynamique sur le cœur. En effet, dans ces conditions, la limitation principale est alors la vitesse d'acquisition : l'impératif d'une géométrie colinéaire pour la SHG empêche alors l'utilisation de microscopie à nappe de lumière, technique de choix à l'imagerie rapide d'échantillons biologiques. En particulier, la modalité privilégiée à l'obtention d'un signal SHG est le balayage point par point, dont la principale limitation est la vitesse d'imagerie.

Ainsi, l'imagerie 3D voire 2D dynamique d'un muscle squelettique ou du muscle cardiaque est compliquée à envisager sans une technique rapide à géométrie colinéaire. Certaines caractérisations ont toutefois été réalisées, en particulier concernant l'étude dynamique de la contraction du sarcomère. Dans la littérature, l'imagerie 2D ou 3D du coeur dynamique en SHG n'a encore jamais été reportée, tant les techniques actuelles ne permettent pas d'atteindre une résolution temporelle proche de résoudre le mouvement cardiaque. Une astuce appliquée aux muscles squelettiques, a été développée par Llewellyn et al. en 2008 [36], et consiste à réduire dimensionnellement le problème. Au lieu de procéder à de l'imagerie 3D voire même 2D, cette étude propose de balayer une même ligne avec une très bonne résolution temporelle, un unique sarcomère dans sa longueur, et au cours de sa contraction. Cette technique de balayage en ligne est utilisée depuis longtemps à l'analyse rapide de processus 1D [37] a été rendue ici possible *in vivo* par le développement d'un micro-endoscope, permettant l'imagerie des sarcomères des muscles squelettiques relâchés et en contraction chez l'homme. Le montage et les résultats dynamiques sont présentés figure 3.12. L'enjeu de la méthode est alors de parvenir à balayer le même sarcomère pendant toute la durée de sa contraction, sans que celui-ci ne s'éloigne de la ligne d'imagerie.

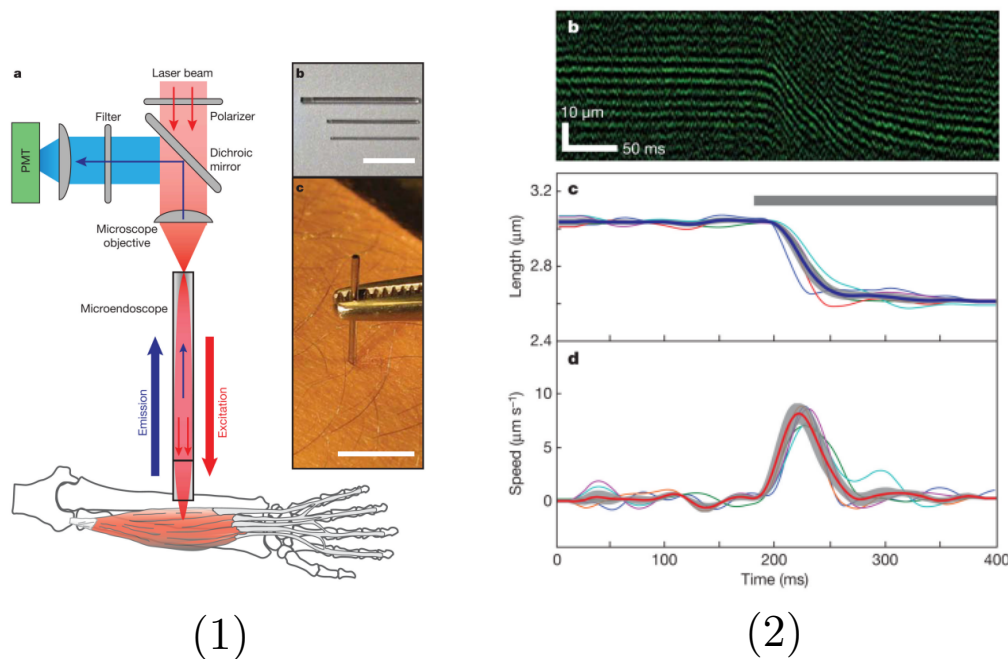


FIGURE 3.12: Étude dynamique des sarcomères squelettiques par balayage de lignes. (1) présente le montage expérimental du micro-endoscope utilisé. (2) présente les résultats de l'imagerie SHG à balayage linéaire lors de la contraction d'un sarcomère. On peut alors déterminer longueur et la vitesse de contraction du sarcomère au cours de la contraction de celui-ci. Adapté de [36].

De manière analogue, Plotnikov et al. [16] ont procédé au même type d'analyse sur un sarcomère *ex vivo* stimulé pour la contraction. La technique est depuis régulièrement re-

prise [38; 39] et permet une analyse dynamique de la contraction, sans avoir recours à l'imagerie 2D ou 3D. Elle n'est cependant pas directement applicable au coeur *in vivo*, notamment parce que les fibres musculaires cardiaque sont enchevêtrées, présentent une courbure importante et se meuvent dans toutes les directions de l'espace pendant la contraction. Il n'est donc pas possible de réduire le problème d'imagerie à une unique dimension de l'espace. Pourtant, par la suite, nous nous proposons de développer une méthode s'inspirant de celle-ci, également basée sur le balayage rapide de ligne, mais permettant la génération d'images 2D et 3D au moyen de reconstructions post-acquisition. Ce procédé vise alors à produire des images à très haute vitesse du muscle cardiaque dynamique, plus spécifiquement en contraste SHG.

### 3.1.3 Déclenchement prospectif, rétrospectif

Pour contourner les limites de vitesse de la microscopie de fluorescence, plusieurs stratégies qui exploitent la périodicité du mouvement cardiaque ont été développées. Dans cette section, nous décrivons ces approches sous les termes de déclenchement prospectif et de déclenchement rétrospectif (*prospective gating* et *retrospective gating*, en anglais, respectivement). Après avoir défini les notions de phase et de période largement utilisées dans la suite du chapitre, puis de périodicité et d'apériodicité cardiaque, nous introduirons les méthodes de déclenchement prospectif et rétrospectif. Enfin, nous discuterons l'utilisation d'un signal référence et l'implémentation de l'imagerie XTYZ.

#### 3.1.3.1 Notions de phase et de période

Dans la suite du chapitre, nous utiliserons spécifiquement deux termes fondamentaux à la compréhension des méthodes présentées : le concept de **la phase** et de **période** du cycle périodique.

- La **phase**  $\phi$  indique une situation instantanée du cycle.
- Dans ce manuscrit, on désignera la **période**  $T$  comme la durée nécessaire à la complétion d'un cycle périodique. C'est aussi le temps qui sépare deux occurrences d'une même phase  $\phi$ .

Il est à noter qu'existe une correspondance forte entre phase et temps : dans le cas d'un mouvement périodique stable, la phase évolue linéairement avec le temps. Ainsi, la phase pourra parfois être exprimée en nombre de points temporels, ou en nombre de pixels lorsque représentée sous forme d'image ( $xt$ ). De la même manière, la période pourra s'exprimer en millisecondes, nombre de points temporels ou pixels, selon le format des données.

#### 3.1.3.2 Périodicité, apériodicité, arythmies

Le coeur est un organe qui bat de manière périodique, c'est-à-dire que son battement se reproduit dans l'espace à l'identique après un intervalle de temps constant, la période  $T$ . Dans la réalité biologique, le coeur n'est jamais strictement périodique et sa période varie typiquement d'environ 1% de sa longueur totale [31] au cours de son battement.

Dans la suite, nous distinguerons avec attention les différents types d'apériodicités qui peuvent survenir au cours du battement cardiaque. Nous désignerons ainsi ces différents types de battements comme étant des battements :

- périodiques, c'est-à-dire que leur mouvement d'un cycle sur l'autre est identique spatialement, et que le coeur bat à un rythme régulier tout au long de sa contraction.
- apériodique temporel linéaire, lorsque la période  $T$  d'un battement est plus longue ou plus courte, mais étendue ou contractée linéairement dans le temps.

- apériodique temporel non-linéaire, lorsque le battement observe une variation non-linéaire temporelle de son battement. La période  $T$  peut alors varier ou être identique aux autres cycles.
- apériodique spatial, lorsque le cœur n’effectue pas le même mouvement spatial comparativement aux cycles standards de battement.

Plus tard dans ce chapitre, nous établirons l’importance de cette classification, ainsi que la nécessité de repérer ces apériodicités tout au long des nos acquisitions. Par ailleurs, les apériodicités temporelles de tous types seront également appelées *arythmies*.

### 3.1.3.3 Principe de l’imagerie par déclenchement

Dans les conditions du dynamique, l’imagerie optique dite directe est bien souvent impossible puisque source d’artefacts décrits à la section 1.3.2.2. Cependant, la périodicité de ces mouvements biologiques est une propriété très avantageuse au point de vue de la vitesse imagerie : le système se trouve de manière répétée dans les mêmes états, à intervalles réguliers. Il est alors possible de collecter le signal commun à différents cycles pour récupérer l’information que l’on ne peut acquérir en un unique passage avec les techniques classiques.

On regroupe sous le terme de **déclenchement** (*Gating* en anglais et dans la littérature) toutes les techniques qui permettent la reconstruction d’images dynamiques par synchronisation, grâce à la propriété de périodicité des phénomènes observés [40]. Ces procédés ont été largement utilisés pour la résolution dynamique des mouvements rapides tels que le battement cardiaque. La technique n’est pas à confondre avec celle de la **stimulation** (*pacings* en anglais et dans la littérature), qui consiste à stimuler de manière périodique ou répétée le système afin de l’imager à un instant contrôlé du cycle (c’est à dire à une phase donnée). Le déclenchement est une méthode passive et consiste à estimer à chaque instant la phase du cycle périodique : lorsque l’estimation se fait a priori et qu’elle permet de déclencher une acquisition au moment opportun au moyen d’un signal additionnel repérant la phase du cycle, le déclenchement est dit prospectif. À l’inverse, si la phase est estimée a posteriori par analyse d’image, permettant une synchronisation adéquate des données, il est alors dit rétrospectif.

Le **déclenchement prospectif** permet de capturer un cliché instantané du cycle et est mis en œuvre au moyen d’une référence externe permettant d’en estimer la phase. Le **déclenchement rétrospectif**, quant à lui, permet de reconstruire une séquence à haute résolution temporelle grâce à l’estimation des phases de ces images a posteriori. Il peut-être également décrit comme une méthode de synchronisation des séquences d’images à posteriori. Il suffit alors de réordonner ces images relativement les unes aux autres par phase croissante. Dans ce cas, la détection de la période et de la phase se font à partir des données d’imagerie elles-mêmes. [41]

### 3.1.3.4 Signal de référence

Le déclenchement est donc une technique passive de reconstruction d’images. Cependant, cela ne signifie pas pour autant que la technique est non-invasive : il reste nécessaire d’acquérir de manière synchrone à l’acquisition un signal modulé par le cycle observé, et ce quelle que soit sa nature, pour permettre l’estimation de la phase. Dans toute la suite de ce chapitre, ce signal supplémentaire sera désigné comme le **signal de référence**.

Dans la littérature, la nature du signal modulé varie selon les modèles et les applications. L’électrocardiogramme (ECG) est un signal de choix chez l’homme ou la souris [42]. Certaines méthodes s’appliquent à réduire physiquement le mouvement cardiaque via un dispositif à cœur découvert [43] afin d’en faciliter l’imagerie, mais perturbent ainsi le mouvement naturel de contraction. De manière générale l’ECG requiert l’apposition d’électrodes au

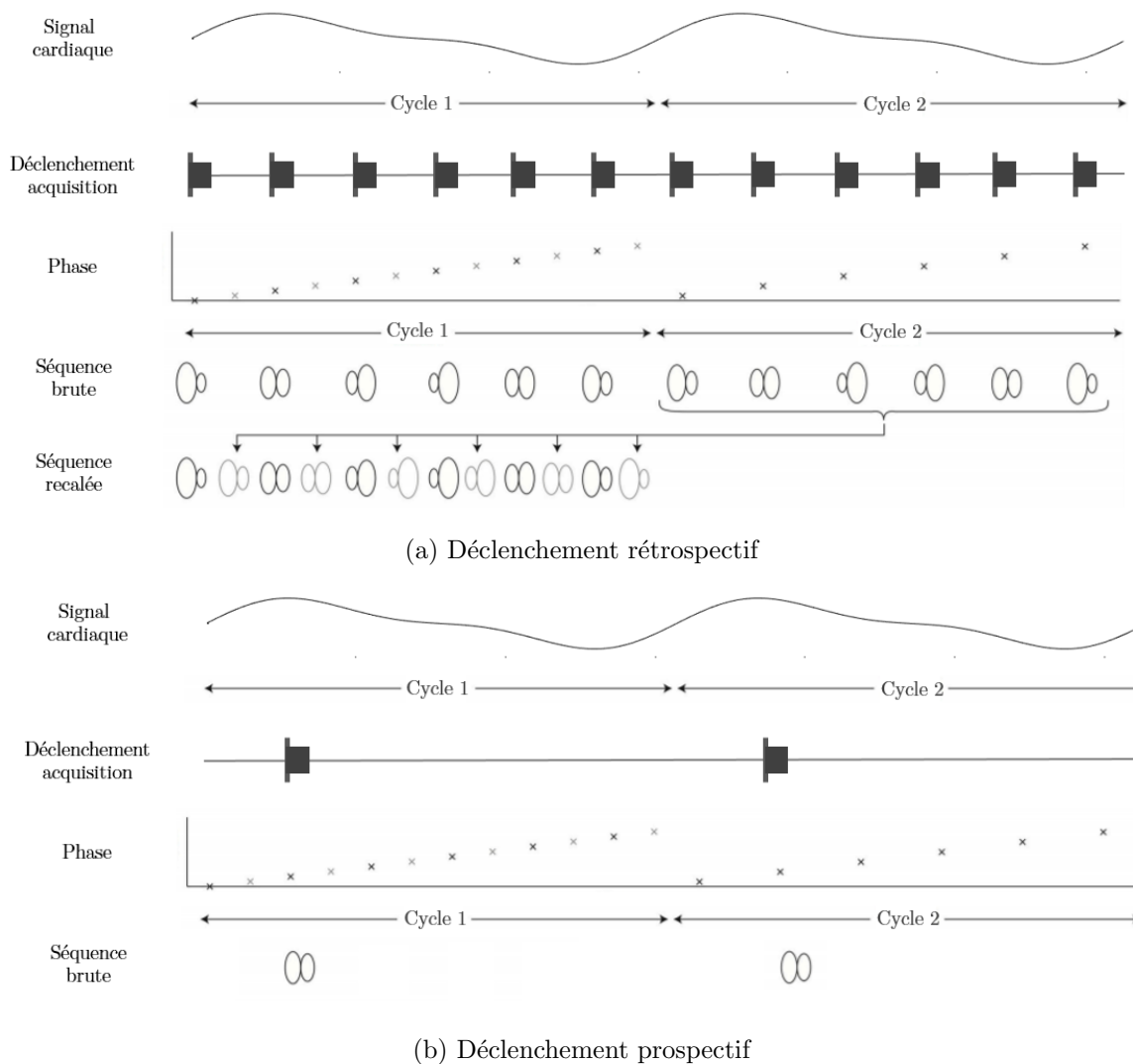


FIGURE 3.13: Principe du déclenchement pour l'imagerie du cycle cardiaque. Le déclenchement rétrospectif utilise le signal périodique pour estimer la phase a posteriori et synchroniser les images acquises en permanence. La méthode prospective utilise ce signal pour déclencher l'acquisition au moment opportun, et ainsi obtenir un cliché du cœur à un instant donné. Adapté de Taylor et al. [40]

contact de l'organisme, ce qui est difficile à reproduire chez de plus petits animaux comme le poisson-zèbre ou le poulet [44; 45]. Bien que des dispositifs portables aient été conçus pour la surveillance cardiaque chez le poisson [46], il apparaît rapidement la limitation des méthodes de contrôle cardiaque au contact, au profit d'une solution optique. Celle-ci est alors complètement non-invasive, et permet au cœur de battre de manière naturelle et dans un environnement physiologique [40].

### 3.1.3.5 Imagerie XYTZ : Synchroniser des plans pour une meilleure résolution temporelle

La résolution temporelle, correspondant au temps séparant deux acquisitions successives du système (une image ou un volume par exemple), est une caractéristique fondamentale de l'imagerie biologique dynamique. Dans le cas de l'imagerie tridimensionnelle et dans le temps du cœur, résoudre les structures spatiales de la contraction requiert alors une excellente résolution temporelle, comme présenté à la section 1.3. Dans ce contexte, le déclenchement rétrospectif a été largement utilisé afin de reconstruire un film à haute-résolution temporelle du cycle de contraction cardiaque.



Une application intéressante de cette méthode a été proposée par Liebling et al. [41], se basant sur une synchronisation intrinsèque a posteriori de plans 2D dans le temps, afin de reconstruire un volume 3D dans le temps. Dans la suite, on appellera la méthode d'imagerie classique d'acquisition d'un volume après l'autre, une **acquisition XYZT**. La méthode implémentée ici inverse alors, grâce à la propriété périodique, les dimensions Z et T : on appellera alors ce type d'acquisition, **acquisition XYTZ**. Cette technique entre dans la catégorie du déclenchement rétrospectif, pour laquelle on utilise directement le signal de l'image elle-même pour la synchronisation.

Ce format d'imagerie 3D rapide consiste alors à synchroniser temporellement des plans 2D rapides dans le temps (xyt) en estimant leur déphasage relatif par maximisation de la correspondance entre deux plans à Z adjacents, comme décrit figure 3.14. En effet, pour la majorité des techniques de microscopie à fluorescence, acquérir un plan dans le temps est bien plus rapide qu'un volume entier. Dans ce cas, la résolution temporelle d'imagerie du volume dans le temps (xyzt) est limitée par son échantillonnage temporel. En tirant avantage de la nature périodique du cœur, il est possible de s'attarder sur un plan durant au moins un cycle de contraction et de synchroniser temporellement les plans entre eux par la suite. Ainsi, l'échantillonnage temporel d'un volume devient celui d'un plan. Il est alors possible de collecter toute l'information d'un volume dans le temps (xyzt) avec une résolution temporelle équivalente à celle d'un plan dans le temps (xyt).

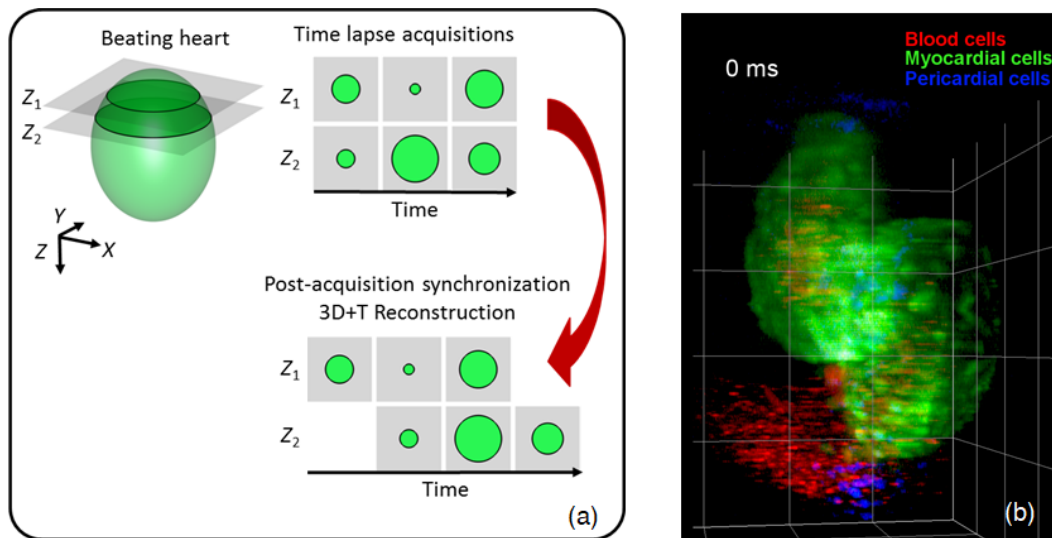


FIGURE 3.14: (a) Reconstruction d'un volume (xyzt) à partir de plan (xyt) périodiques dans le temps. Chaque plan, qui contient l'information d'au moins un cycle, est synchronisé temporellement en déterminant le déphasage correspondant au maximum de correspondance avec les plans adjacents. (b) Cœur de poisson-zèbre reconstruit par synchronisation post-acquisition, issu de [30]. Capture d'écran d'une vidéo 4D (xyzt) à 50 volumes par seconde.

Prenons l'exemple d'un jeu de données tridimensionnel XYZ, de dimension  $300 \times 300 \times 20$  voxel, où l'on s'attarde  $\delta t = 2\mu\text{s}$  sur chaque voxel de l'image. La résolution temporelle, c'est-à-dire le temps entre deux images, est le temps nécessaire au balayage de tous les voxels du volume. La fréquence d'imagerie atteinte est alors :

$$f_{XYZT} = f_{3D} = \frac{1}{300 \cdot 300 \cdot 20 \cdot \delta t} = 0.28\text{Hz} \quad (3.1)$$

En revanche, si l'on utilise la propriété périodique du cœur et que l'on acquiert les coupes

XYT séquentiellement pour reconstruire le volume XYTZ ultérieurement, la fréquence d'imagerie devient :

$$f_{\text{XYTZ}} = f_{2\text{D}} = \frac{1}{300 \cdot 20 \cdot \delta t} = 5.6\text{Hz} \quad (3.2)$$

De fait, il est possible de reconstruire des volumes entiers avec une résolution temporelle effective 20 fois supérieure. En effet, cela correspond simplement au nombre de plans consécutifs qu'il aurait fallu scanner avant de passer au volume suivant. Cependant, dans le cadre de la méthode décrite en [41], le temps s'écoulant entre deux images devient par extension le temps s'écoulant entre deux volumes entiers, moyennant un traitement a posteriori. Cette technique a depuis été reprise [30; 31] pour l'imagerie dynamique d'un cœur de poisson-zèbre en microscopie à nappe de lumière. Grâce aux avantages combinés de l'acquisition de plans 2D rapides via microscopie à nappe de lumière et du déclenchement rétrospectif, la méthode atteint des vitesses de plusieurs centaines de volumes par seconde. Cependant, et bien qu'étant une amélioration remarquable par rapport aux techniques classiques, cette vitesse d'acquisition n'est toujours pas suffisante pour résoudre les mouvements les plus rapides du cœur.

Dans le projet présenté dans ce chapitre, nous proposons d'étendre le principe de l'imagerie XYTZ (2D vers 3D), en dimension 1 (1D vers 2D vers 3D). L'objectif est alors d'augmenter la résolution temporelle effective des reconstructions à l'aide d'une méthode d'acquisition et de synchronisation de séquences d'acquisitions en ligne, c'est-à-dire une méthode **d'imagerie XTYZ**. A l'instar du gain notable en résolution temporelle obtenu en inversant la dimension Z et T, nous cherchons à l'améliorer d'avantage en inversant les dimensions Y et T. Nous discuterons alors les similitudes de la méthode avec celle des acquisitions XYTZ, mais aussi ses spécificités. Nous nous attarderons également sur les solutions mises en œuvre, permettant de reconstruire un volume tridimensionnel dans le temps (xyzt) à partir de lignes séquentiellement balayées (xt).

## 3.2 Exploiter la périodicité pour imager plus vite

### 3.2.1 Stratégie et objectifs de l'imagerie XTYZ

#### 3.2.1.1 Principe de l'imagerie XTYZ

L'imagerie XYTZ permet alors de reconstruire un volume tridimensionnel de dimension  $n_X \times n_Y \times n_Z$  voxels avec une résolution temporelle  $n_Z$  fois supérieure à la méthode XYTZ, grâce à une acquisition séquentielle de plans dans le temps. Il paraît alors naturel de tenter d'étendre le principe à la reconstruction d'abord d'un plan, puis d'un volume afin de profiter d'un gain supplémentaire sur la résolution temporelle. Pour ce faire, il suffit d'extrapoler en dimension 1 la méthode précédente. Les lignes séquentielles périodiques sont d'abord reconstruites en images 2D, puis en volume 3D, comme illustré figure 3.15.

Ainsi, il est possible de gagner un facteur  $n_Y n_Z$  sur la résolution temporelle, où  $n_Z$  est le nombre de plans en Z par volume, et  $n_Y$  le nombre de lignes par plan. Les équations 3.2 et 3.1 témoignent alors d'un gain d'un ordre de grandeur, typique du nombre de plans nécessaires à l'imagerie 3D. En revanche, le nombre de lignes nécessaires à la formation d'une image 2D peut atteindre 500 pour les grands champs de vue. Le gain à tirer d'une acquisition XTYZ est alors substantiel. En reprenant l'exemple établi dans la partie 3.1.3.5 d'un jeu de données de 300x300x20 voxels, la fréquence d'imagerie associée à une acquisition XTYZ devient :

$$f_{\text{XTYZ}} = f_{1\text{D}} = \frac{1}{300 \cdot 20 \cdot \delta t} = 1667\text{Hz} \quad (3.3)$$

Le mode d'acquisition XTYZ permet théoriquement une fréquence d'imagerie tridimensionnelle supérieure au kilohertz et ce pour des champs de vue importants en microscopie à

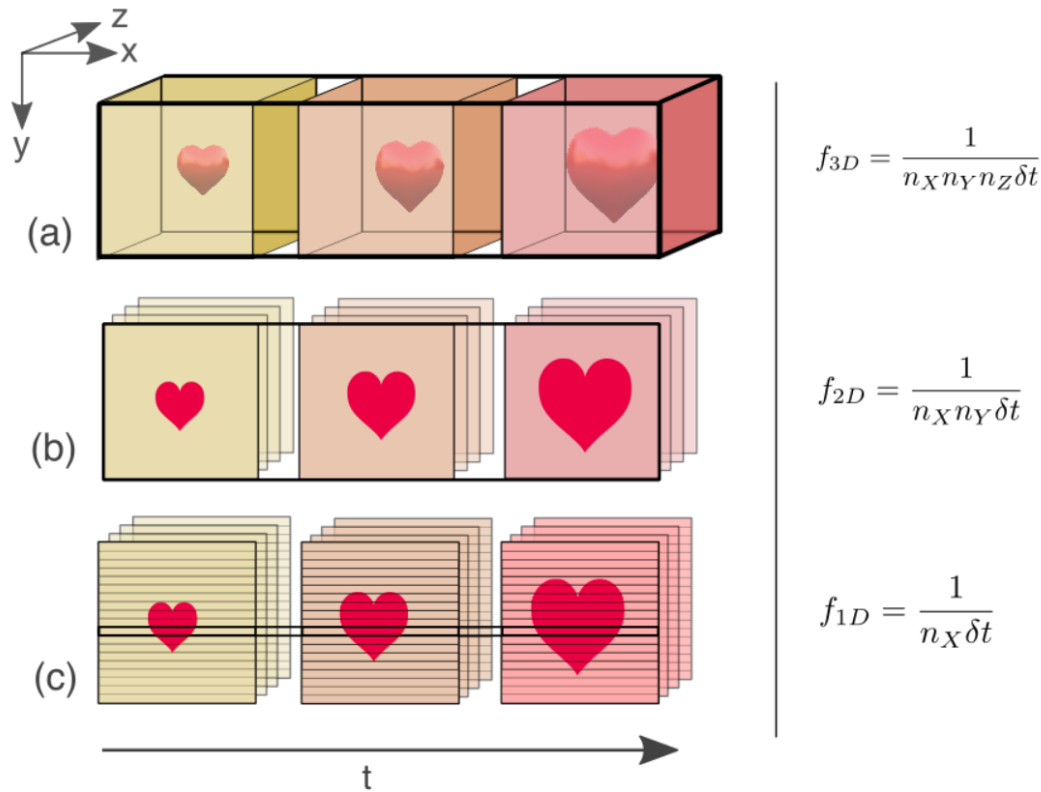


FIGURE 3.15: Acquisition de lignes séquentielles périodiques pour améliorer la vitesse d'imagerie. (a) Balayage XYZT : on procède de manière classique en balayant chaque voxel du volume ( $n_X, n_Y, n_Z$ ) l'un après l'autre, pendant un temps  $\delta t$ . (b) Balayage XYTZ : méthode développée par Liebling et al. [41] consistant à imagier séquentiellement les plans du volume sur une période complète avant de passer au plan suivant. (c) Balayage XTYZ : extrapolation en dimension 1 de la méthode précédente. Les lignes séquentielles périodiques sont d'abord reconstruites en images, puis en volume.

fluorescence : pour ce type d'acquisition, la résolution temporelle du volume devient la fréquence de balayage d'une ligne. Dans les faits, il existe des limitations matérielles de balayage d'un faisceau sur l'échantillon qui peuvent réduire la vitesse d'imagerie. Elles seront discutées plus tard dans ce chapitre.

La première étape de la reconstruction XTYZ, c'est-à-dire d'un volume, est d'abord de reconstruire les images 2D rapides successives : ce sont les acquisitions XTY. Dans la pratique, ce mode XTY est simple à implémenter : il suffit de balayer de manière répétée une même ligne pendant au moins une période temporelle du mouvement observé. La méthode est décrite visuellement figure 3.16. Dans le cas idéal (a), il serait possible d'acquérir rapidement un plan instantané où tous les pixels sont imagés simultanément. De la sorte, on s'affranchirait de toute forme d'artefacts liés à un balayage trop lent des voxels de l'image. Dans la réalité de la géométrie du balayage point par point XYT, l'objet périodique continue de bouger tout au long de l'acquisition de l'image. C'est ce qui est exposé en (b) : la phase du dernier pixel balayé peut être très éloignée de celle du tout premier, provoquant ainsi une déformation de l'image obtenue. La solution d'acquisition XTY présentée en (c) permet de contourner cet écueil, en balayant dans le temps avant de balayer les lignes successives. Dans la pratique, cela correspond à acquérir de manière répétée une même ligne le plus rapidement possible durant au moins une période du cycle observé avant de passer à la ligne suivante.

L'image ( $xt$ ) ainsi obtenue est alors riche en information, en particulier temporelle. Elle

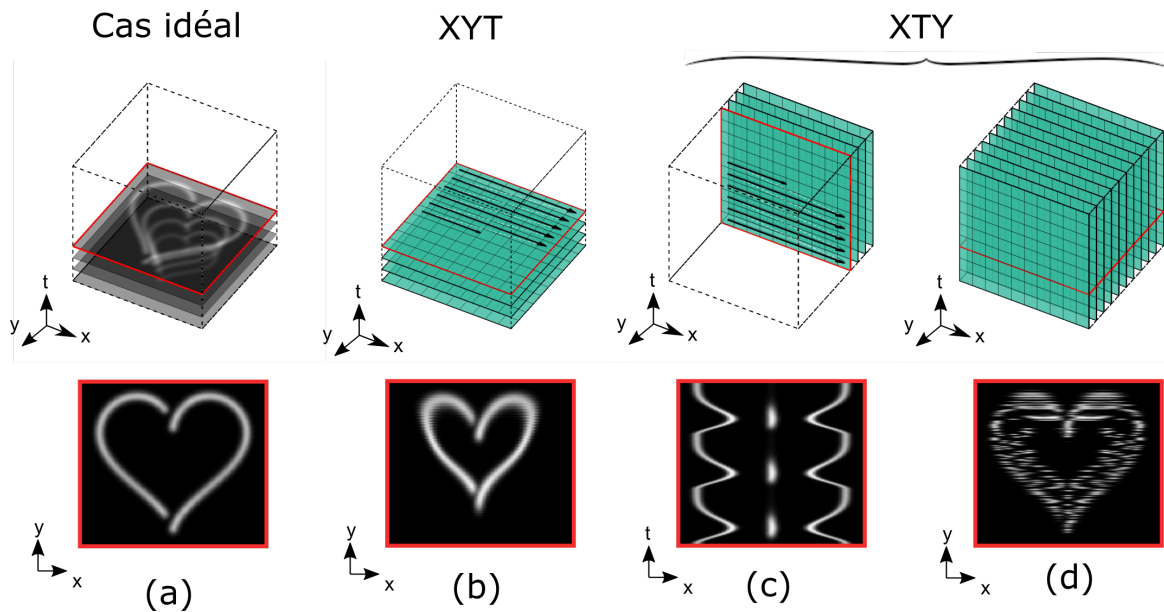


FIGURE 3.16: Comparaison des modes XYT et XTY pour l'acquisition d'un plan dynamique. (a) correspond à l'image telle qu'elle serait si l'on pouvait acquérir un plan instantanément et donc sans artefact de balayage. (b) est le mode d'acquisition "classique" XYT dont l'image est déformée par artefact de balayage. (c) est le mode d'acquisition XTY, dont la spécificité est de créer des images temporelles d'une ligne que l'on appelle kymogrammes. Ces images révèlent le caractère périodique de l'acquisition. (d) décrit l'image (xy) brute d'une acquisition XTY : les lignes, bien que contenant toute l'information d'une période, sont déphasées entre-elles et requièrent une synchronisation a posteriori.

sera très utile pour estimer avec précision la période, la robustesse ou encore la dynamique des oscillations. On appelle ce type d'image un **kymogramme**.

Cependant, c'est en observant (d) que l'on comprend le véritable enjeu de l'acquisition XTY : le déphasage entre les lignes d'une même image. En effet, bien que celle-ci comprenne toute l'information d'un cycle, les lignes successives ont été acquises à des phases différentes et indépendantes. De ce fait, lorsque l'on s'intéresse aux plans individuels (xy) du jeu de donnée, il apparaît clairement que les lignes sont décorrélées les unes par rapport aux autres. À l'instar des approches de synchronisation post-acquisition développées dans [41], l'essentiel du travail repose sur la synchronisation des lignes dans le temps. Malgré les similitudes fortes entre la problématique de reconstruction 2D vers 3D et 1D vers 2D, la suite du chapitre détaille les nombreuses spécificités à la synchronisation XTY.

### 3.2.1.2 Reconstruction d'un plan par synchronisation de lignes a posteriori

La déphasage entre les lignes se remarque d'autant mieux que l'on déplie l'image temporellement, c'est-à-dire sur les kymogrammes (xt) générés à partir de chaque ligne. La figure 3.17 expose la différence entre une image parfaitement reconstruite (a) et une image (xy) dont les lignes sont décorrélées (b). L'image (xyt) apparaît alors brouillée : en réalité, la phase de chaque ligne n'est pas totalement aléatoire. Le déphasage d'une ligne à l'autre est en fait assez similaire, puisqu'il dépend du temps d'acquisition de la ligne. Cependant, dans le cas général, le temps entre le début de l'acquisition de deux lignes successives n'est pas un nombre entier de périodes. Les kymogrammes dérivent donc dans la direction temporelle (b).

Ainsi et comme le fait apparaître 3.17, pour reconstruire l'image réelle il suffit de déterminer pour chaque ligne le déphasage  $\Delta\phi_i$  nécessaire à la synchronisation de phase des lignes. Dans l'espace (xt) des kymogrammes, cela correspond à estimer le décalage temporel

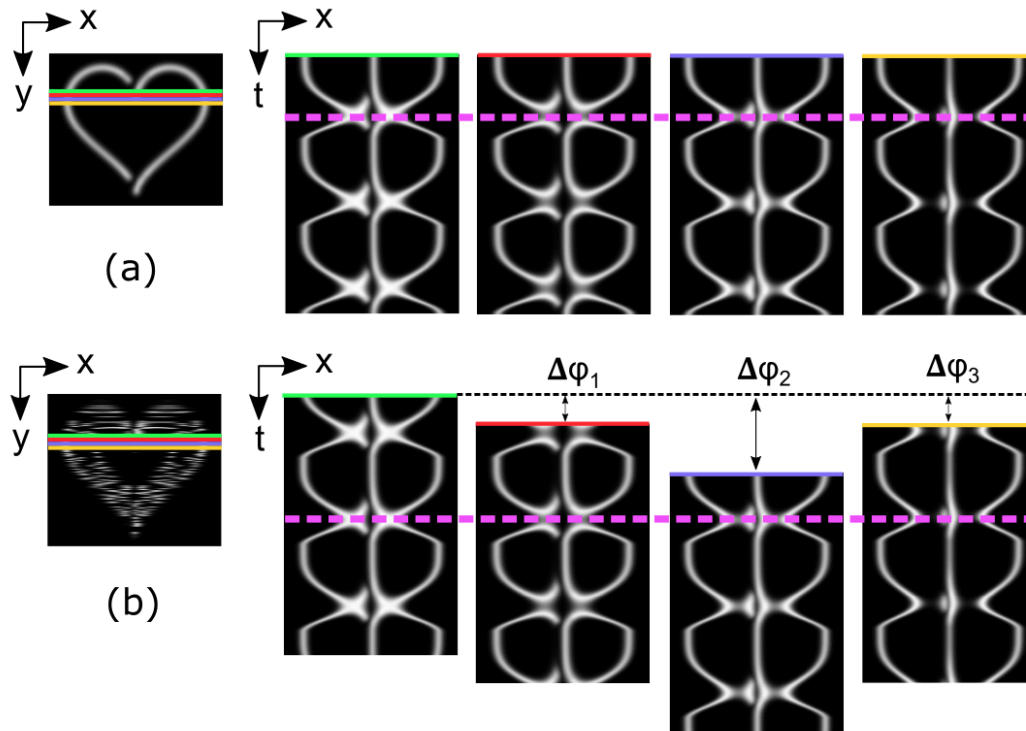


FIGURE 3.17: Utilité de la représentation en kymogrammes ( $xt$ ) pour la synchronisation temporelle des lignes  $y$ . (a) décrit l’allure des kymogrammes pour des lignes successives dans le cas idéal d’une image parfaitement synchronisée. (b) correspond à ces mêmes kymogrammes pour une image obtenue par acquisition XTY : le déphasage se matérialise par une dérive dans le direction temporelle. La synchronisation consiste alors à compenser ce décalage temporel d’une ligne à l’autre.

permettant la synchronisation des images entre elles. Ainsi, il y a une correspondance entre le déphasage  $\Delta\phi$ , et le décalage temporel  $\Delta t$ , puisque dans le cas d’une oscillation régulière du cœur, la phase dépend linéairement du temps. Par ailleurs, en travaillant à partir des kymogrammes, le problème de la synchronisation temporelle s’apparente alors à un problème bien connu de traitement de l’image : le **recalage d’images**, spatial cette fois (*registration* dans la littérature). Pour ce problème, il y a donc équivalence entre le déphasage  $\Delta\phi$ , le décalage temporel  $\Delta t$  et le décalage spatial sur l’image.

### 3.2.1.3 Limite de la synchronisation par maximisation de correspondance

Dans la littérature, notamment dans celle reprenant la technique développée par Liebling et al. dans [41], la synchronisation des plans ( $xyt$ ) en volume ( $xyzt$ ) par acquisition XYTZ se fait au moyen d’une maximisation de la correspondance entre les plans ( $xyt$ ) par déphasages  $\Delta\phi_i$  de ces derniers. Cela correspond à trouver, pour deux plans ( $xyt$ ) adjacents, le décalage temporel  $\Delta t_i$  (équivalent au déphasage  $\Delta\phi_i$ ) tel que les plans ( $xyt$ ) se superposent le mieux selon une certaine métrique. La méthode est illustrée figure 3.14. Cela présuppose que les plans adjacents partagent de l’information commune permettant leur mise en correspondance. Pour la comparaison des images, Liebling et al. n’utilisent pas directement les images 4D [47] : elles sont trop coûteuses à exploiter pour le traitement. La synchronisation se fait alors au moyen de transformées en ondelettes, une représentation multi-échelle temps-fréquence des images [48], permettant une reconstruction robuste à moindre coût de calcul. Cette technique se trouve très adaptée au cas des reconstructions des acquisitions XYTZ, pour deux raisons principales. D’abord, la maximisation de correspondance se fait entre volumes ( $xyt$ ) : cela permet de comparer une grande quantité de voxels, ce qui a pour effet de rendre la métrique de

corrélation très robuste et précise. Par ailleurs, la reconstruction d'un volume se fait à partir d'un nombre assez faible de plans (de l'ordre de la centaine en général). Ainsi, la méthode de maximisation de la correspondance induisant des propagations d'erreurs de proche en proche, elle devient source d'artefact de reconstruction pour un nombre plus important d'objets à recalcr. Nous montrerons dans la suite que cette approche n'est pas adaptée au problème de la synchronisation de lignes en plans ; elle conduit en particulier à une propagation d'erreur importante et à une reconstruction sujette aux artefacts, ne reflétant donc pas la réalité biologique. Pour répondre à ce problème, il est nécessaire de développer une stratégie de reconstruction adaptée spécifiquement au cas des acquisitions XTYZ.

### 3.2.1.4 Note sur les notions d'exactitude et de précision

Notons que pour caractériser la qualité de nos reconstructions, il est nécessaire d'estimer quantitativement dans quelle mesure elles produisent une image fidèle à la réalité biologique, et de façon reproductible. Ces deux notions correspondent aux termes d'**exactitude** et de **précision** (respectivement *accuracy* et *precision* en anglais). Bien qu'elles puissent sembler similaires dans le langage courant, elles sont dans le domaine scientifique deux notions différentes et complémentaires qu'il est important de définir ici. Comme représenté sur la figure 3.18, l'exactitude permet de quantifier la proximité entre les résultats de la mesure et la valeur réelle. La précision quantifie quant à elle la dispersion des données. Ces deux caractérisations sont indépendantes l'une de l'autre et définissent la qualité du système de mesure. Dans ce chapitre, la caractérisation de l'exactitude et de la précision de la reconstruction XTYZ sera un enjeu fondamental, en vue de son optimisation.

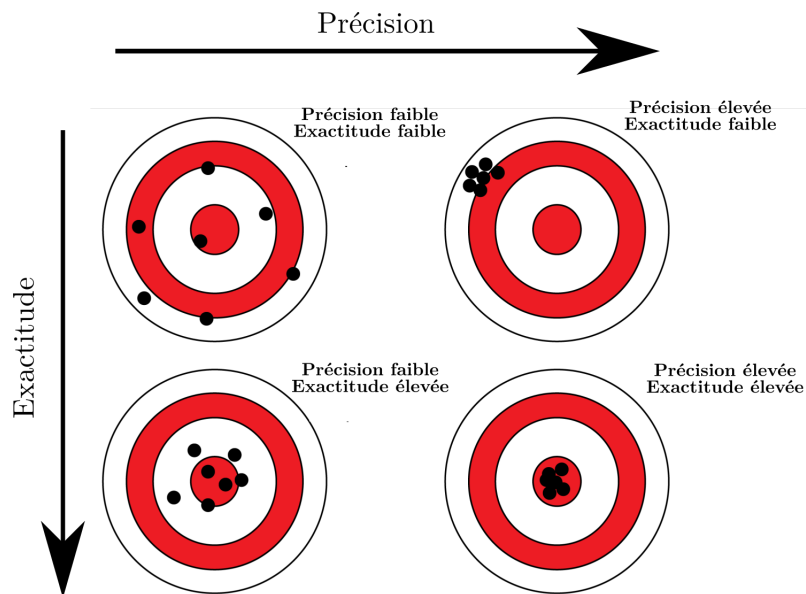


FIGURE 3.18: Schéma explicatif de la différence entre exactitude et précision. L'exactitude quantifie la distance de la moyenne à la vraie valeur, c'est-à-dire l'erreur systématique. La précision est une description de la dispersion. Adapté de Wikipedia.

### 3.2.1.5 Objectifs et stratégie adoptés : vers une imagerie XTYZ exacte et précise

La reconstruction d'acquisitions XTYZ est alors un problème complexe qui requiert des solutions adaptées à la synchronisation d'un nombre important de lignes dans le temps. L'objectif principal de notre reconstruction est qu'elle permette de reconstruire des images qui soient représentatives de la réalité biologique, et qu'elles présentent un minimum d'artefacts liés à la reconstruction. En d'autre terme, nous souhaitons développer une méthode de reconstruction *exacte et précise*.

Nous allons ainsi détailler l'implémentation d'une routine de synchronisation de phase post-acquisition spécifique au problème de reconstruction de plans dynamiques ( $xyt$ ) à partir de séquences de lignes dynamiques ( $xt$ ), finalement synchronisés pour la reconstruction de volumes dynamiques ( $xyzt$ ). Pour contourner les problèmes d'artefact de reconstruction détaillés plus haut, deux techniques de synchronisation complémentaires seront associées. Tout d'abord, le recours à une synchronisation exacte, mais peu précise. Celle-ci tire profit d'un signal de référence externe indépendant du signal utile d'imagerie (fluorescence, SHG, THG), évitant ainsi la propagation d'erreurs. Une seconde approche de synchronisation plus précise sera ensuite mise en œuvre : elle se base sur la maximisation de correspondance entre images ( $xyt$ ) et permet le lissage des zones rapides que la technique de référence ne peut ajuster avec précision. Au final, l'action combinée des deux étapes permet une synchronisation exacte et précise des lignes. Le tout est décrit par le diagramme 3.19.

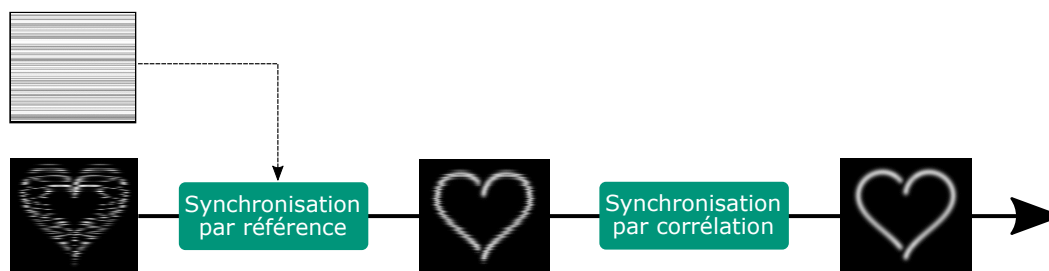


FIGURE 3.19: Diagramme de fonctionnement de la chaîne de traitement de la synchronisation XTY. De l'image brute XTY, on utilise la référence pour synchroniser l'image de manière exacte, mais peu précise. Une seconde itération de synchronisation par corrélation est ensuite utilisée pour affiner le résultat et rendre la synchronisation exacte et précise.

Ces deux techniques permettent de tirer profit des approches de déclenchement prospectif et rétrospectif : d'une part l'apport d'un signal modulé permettant d'estimer la phase de manière robuste et indépendante du signal. Par ailleurs, nous reconstruisons une séquence vidéo très haute résolution grâce à une synchronisation a posteriori, comme le permet le déclenchement rétrospectif.

### 3.2.2 Dispositif d'acquisitions XTYZ avec signal de référence

Nos acquisitions XTYZ nécessitent alors un signal externe de référence, modulé par le battement cardiaque, et indépendant du signal utile d'imagerie. L'implémentation de ce signal doit être compatible avec le dispositif commercial optimisé pour la détection de la SHG que nous utiliserons pour l'imagerie du cœur.

L'objectif de cette section est alors de proposer une implémentation de ce signal additionnel de référence, sur un microscope commercial dont l'utilisation est mutualisée au sein du laboratoire. Dans cette section, nous détaillerons le développement d'un module de référence amovible permettant l'obtention d'un tel signal, ainsi que son intégration au dispositif, sans qu'il ne porte atteinte à son fonctionnement normal. Nous montrerons qu'avec un arrangement astucieux des chemins optiques et de la détection, il est possible d'obtenir une configuration telle que nous pouvons imager cinq canaux simultanément : deux de fluorescence (en épifluorescence), deux pour les signaux d'harmonique (SHG/THG), et un dédié spécifiquement à la référence.

### 3.2.2.1 Système commercial avant modification

Le système commercial avant modification est présenté image (a) de la figure 3.20. Toutes les images XTYZ ont été acquises sur un microscope multiphoton commercial (TriMScope II, LaVision BioTec) équipé de deux oscillateurs ultra-rapides (Mai Tai HP DeepSee,  $\lambda = 690 - 1040\text{nm}$ , Spectraphysics and Insight DeepSee,  $\lambda = 690 - 1300\text{nm}$ , Spectra Physics), représentés au (a) de la figure 3.20. Les signaux de fluorescence ont été collectés vers l'arrière et séparés des faisceaux d'excitation par un miroir dichroïque (T695lpxr, Chroma) et un filtre passe-haut (ET700SP, Chroma).

La configuration du montage est optimisée pour les acquisitions multimodales 5 canaux XYZT. Ainsi, dans le module d'épi-détection, les photons en dessous et au-dessus de  $\lambda = 560\text{nm}$  sont spatialement séparés par un miroir dichroïque (FF560-FDi01 Semrock) : les photons au-dessus seront collectés par un tube photomultiplicateur GaAsP "rouge", quand les photons d'une longueur d'onde inférieure seront séparés a posteriori par un autre miroir dichroïque à  $\lambda = 495\text{nm}$ . Les faisceaux sont alors redirigés vers un tube photomultiplicateur (PMT) "bleu et vert" en fonction de leur longueur d'émission (H6780-01 et H7422-40, Hamamatsu). Avant la collecte, les photons sont filtrés par un filtre passe-bande antiparasite FF01-607/70-25, Semrock pour le rouge, FF01-450/70, Semrock pour le canal bleu et FF01-539/30, Semrock pour le canal vert.

Le bloc de transmission est composée de deux tubes photomultiplicateur (PMT), et permet de collecter le signal émis dans la direction avant, direction privilégiée du signal SHG et THG. À cet égard, ces voies de détections sont optimisées pour la détection de ces deux types de signaux. Le faisceau est d'abord redirigé vers le bloc via un miroir dichroïque passe-bas à  $\lambda = 695\text{nm}$  (T695lpxr, Chroma). Au sein même du bloc de détection, un filtre passe-haut (ET700SP, Chroma) permet de couper les faisceaux d'excitation résiduels, puis un nouveau filtre dichroïque permet de filtrer les photons au-dessus et en dessous de  $\lambda = 442\text{nm}$ .

**Un système optimisé pour la SHG** Le microscope commercial TriMScope utilisé pour nos acquisitions est un montage optimisé pour la détection de signaux cohérents. D'abord, et comme nous l'avons déjà établi, la direction avant est la direction privilégiée du génération de signal SHG. Sur le dispositif, la détection des signaux d'harmoniques se fait alors dans cette direction, grâce à une détection en transmission, au moyen d'un module dédié placé sous le microscope. Par ailleurs, l'excitation a également été adaptée : nous utilisons ici des impulsions courtes, de l'ordre de 100 fs, précompensées pour la dispersion. Nous permettons alors de maximiser les effets non-linéaires au volume focal. Enfin, la détection aussi a été optimisée, avec l'utilisation de détecteur GaAsP plus sensibles, permettant de tirer profit de chaque photon cohérent atteignant le détecteur.

Grâce à cette optimisation, ce dispositif nous permet de collecter des images en SHG du coeur, quand bien même celui-ci présente des signaux faibles. L'une d'entre elle est notamment visible, en SHG et THG combinées, à la figure 3.49.

### 3.2.2.2 Modification du système, ajout du module de référence

Plusieurs modifications ont alors été effectuées pour permettre l'imagerie XTYZ sur ce dispositif. La première concerne le logiciel de contrôle du microscope, Inspector, développé lui aussi par LaVision BioTec. Le logiciel permet le pilotage de tous les éléments nécessaires à l'acquisition : niveau de puissance laser, position de la platine, champ de vue, vitesse de balayage ou encore résolution de l'image. Afin de permettre l'imagerie XTYZ, LaVision nous a fourni une version modifiée du logiciel permettant la répétition du balayage des lignes,



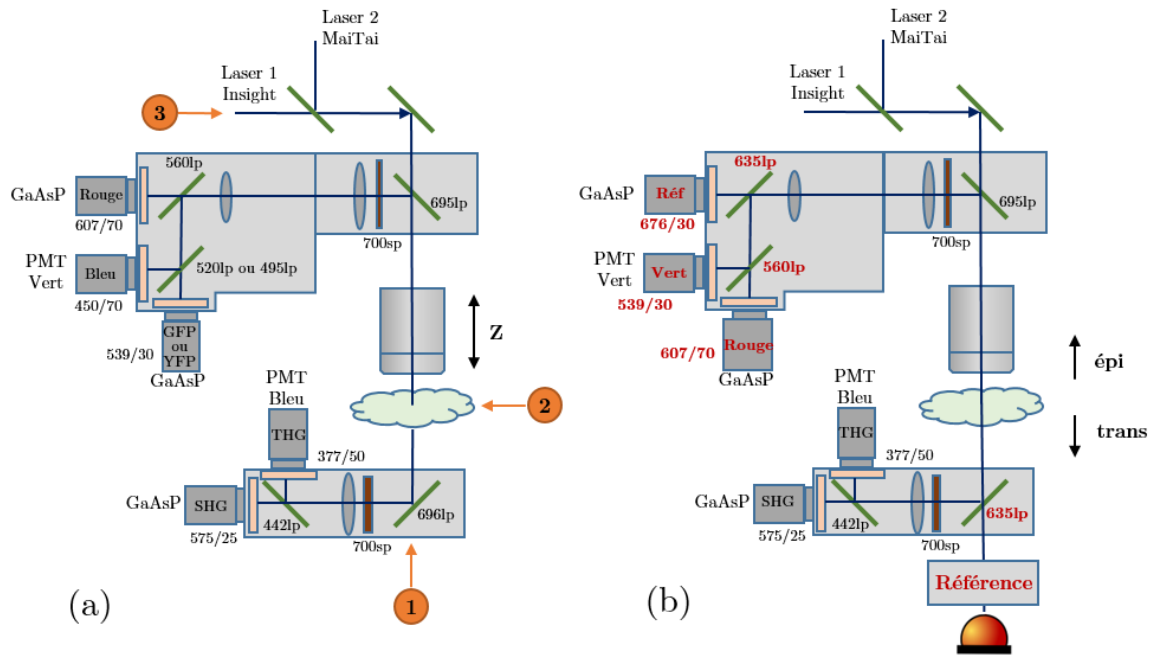


FIGURE 3.20: Schéma du montage expérimental du microscope TriMScope et de l'implémentation du module de référence. (a) Montage expérimental tel qu'il a été conçu pour les acquisitions XYZT. L'échantillon est illuminé au moyen de deux lignes laser indépendantes. Deux blocs de détection permettent la collection du signal en épi (fluorescence) et transmission (SHG/THG). Le bloc en épi-détection permet de collecter trois signaux simultanément : rouge, vert et bleu. Les trois options possibles à l'implémentation de la référence sont repérées par les pastilles 1 à 3. (b) Montage expérimental adapté à l'imagerie XTYZ, avec notamment l'ajout du module de référence. Les PMT ont été réarrangés pour collecter le signal de référence sur le PMT rouge, tout en conservant deux canaux pour la fluorescence rouge et verte. Les modifications des optiques spécifiques à l'ajout de la référence apparaissent en rouge sur le schéma.

c'est-à-dire inverser les dimensions Y et T. Ce mode, absent des autres versions, permet ainsi l'imagerie d'abord d'une ligne dans le temps, avant de passer aux suivantes. La seconde concerne l'ajout d'un module de référence, dont l'implémentation requiert la modification des certains chemins optiques qui seront détaillés dans le paragraphe suivant 3.2.2.2.

Le cahier des charges de notre signal de référence est le suivant : il faut un signal synchrone avec l'acquisition, modulé par le cycle cardiaque, non-invasif, qui reste identique tout au long de l'acquisition en particulier quelle que soit la position en Z de l'imagerie. Par ailleurs, il doit être implémenté sur le dispositif déjà existant et ne doit pas altérer l'acquisition des signaux de fluorescence et d'harmoniques (SHG/THG). Pour répondre à ces impératifs, nous avons décidé d'implémenter un signal optique externe modulé par le cœur via un module additionnel, à intégrer au montage expérimental. Ainsi, plusieurs alternatives d'implémentation de cette référence ont été débattues. Elles apparaissent également sur le schéma (a) de la figure 3.20 et sont les suivantes :

- ① En aval du bloc de détection en transmission. L'illumination de référence traverse alors le miroir dichroïque du module de détection, éclaire l'échantillon et est ensuite collecté par le bloc en épi-détection.
- ② Illumination directe sur l'échantillon via un accès horizontal. Une partie du signal est alors redirigée orthogonalement et peut alors être collectée en épi comme en transmission.

- ③ Via le chemin d'illumination des lasers, grâce à une ligne d'illumination supplémentaire dont le montage dispose déjà, mais qui doit être compatible avec les éléments de filtrage déjà existants.

Chaque méthode présente certains avantages et inconvénients, que nous avons étudiés et rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Position	Avantages	Inconvénients	Contraintes techniques
①	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implémentation simple</li> <li>- Illumination de Köhler possible</li> <li>- Bouge avec l'échantillon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altère le signal d'imagerie sur les PMT ?</li> <li>- Réarrangement des dichroïques nécessaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doit traverser le dichroïque en entrée du module trans</li> <li>- Doit être réfléchi par le dichroïque en entrée du module épi</li> <li>- Ne doit pas empiéter sur les bandes spectrales d'imagerie</li> </ul>
②	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de dichroïque à traverser</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difficile à implémenter</li> <li>- Pas de sectionnement</li> <li>- Beaucoup de diffusion</li> <li>- Peu de contraste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ne doit pas empiéter sur les bandes spectrales d'imagerie</li> <li>- Doit pouvoir illuminer l'échantillon latéralement</li> </ul>
③	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ligner laser disponible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Détection du signal émis en épi</li> <li>- Rencontre beaucoup de miroirs dichroïques</li> <li>- Doit être défocalisé axialement</li> <li>- Bouge en z avec l'objectif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doit suivre me chemin laser (prévu infrarouge)</li> <li>- Doit pénétrer le bloc d'épi-détection</li> </ul>

FIGURE 3.21: Tableau des avantages et désavantages des positions envisagées pour le module de référence.

À partir de cette analyse, c'est la solution ① qui a été finalement adoptée, pour plusieurs raisons. Le premier argument concerne la simplicité de l'implémentation sous le module de détection SHG/THG. En effet, cette option est celle qui offre le plus de flexibilité de par l'espace disponible en pratique, sous le microscope. Le second argument est qu'il est alors possible d'implémenter une illumination de Köhler, qui permettra d'avoir meilleur contrôle sur la partie de l'échantillon éclairée et donc une meilleure modulation. Enfin, sur ce montage, c'est le déplacement de l'objectif auquel est attaché le module d'épi-détection qui permet l'imagerie en z de l'échantillon. Le condenseur qui focalise le faisceau de la référence quant à lui, est solidaire de la platine sur laquelle repose l'échantillon. En éclairant par en-dessous, son illumination et donc le signal de modulation resteront inchangés lors d'un mouvement en z. Cet argument est détaillé dans le paragraphe 3.2.2.2

Des précautions restent alors à être prises pour éviter que le signal de référence soit collecté dans les PMT du signal utile d'imagerie. À cet égard, le choix de la longueur d'onde de la référence est alors crucial, de même que quelques modifications astucieuses du chemin optique jusqu'au bloc d'épi-détection (miroirs dichroïques et filtres passe-bande). En pratique, nous avons donc développé un module d'éclairage de la référence, amovible, greffable à notre montage expérimental 2p-LSM. Comme le montre la figure 3.20, le module a été placé juste après le bloc de détection en transmission en ①. La géométrie permet à une LED supplémentaire d'illuminer l'échantillon en vue de moduler le faisceau incident par le battement cardiaque, pour être ensuite collecté par l'objectif du microscope et redirigé vers le bloc d'épi-détection. La collection du signal de référence se fait alors sur un PMT synchrone avec celui du signal 2PEF/SHG. La longueur d'onde du signal de référence a été choisie pour ne pas interférer avec les signaux 2PEF et SHG, mais aussi pour atteindre le PMT dans le module d'épi-détection. Pour ce faire, le signal doit passer par un premier miroir dichroïque passe-bas adapté (Di02-R635) pour rediriger le signal SHG vers les détecteurs en transmission et être réfléchi par le second vers le module d'épi-détection à 695nm. De plus, il est important que l'émission de la référence n'empiète pas sur gamme spectrale utile à la collection du signal 2PEF, SHG ou THG. Par principe de précaution, on évitera alors la gamme de  $\lambda = 360\text{nm}$  (THG @1100 nm) à  $\lambda = 650\text{nm}$  (fin du spectre d'émission des protéines fluorescentes rouges).

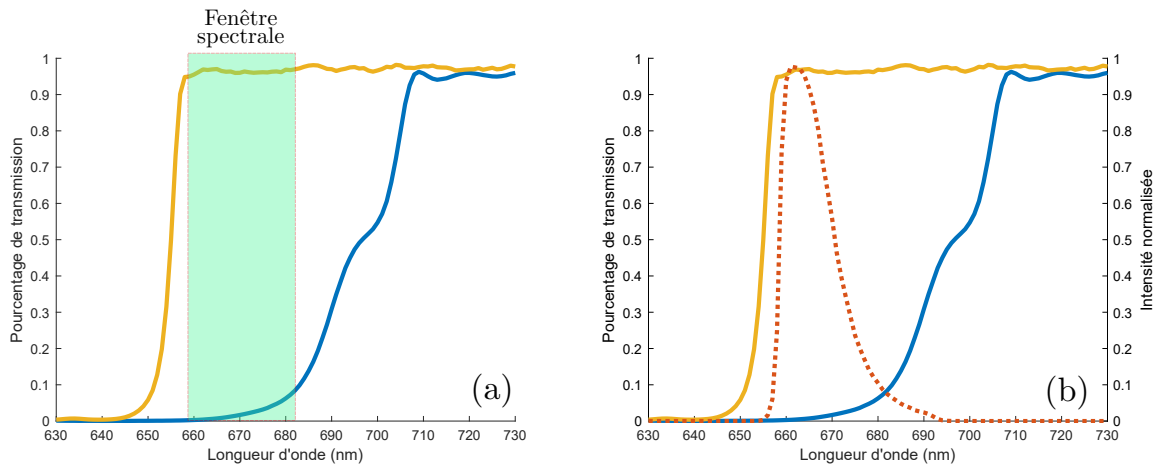


FIGURE 3.22: Courbes de transmission et d'intensité normalisées des miroirs dichroïques et filtres utilisés. (a) décrit la courbe de transmission du dichroïque du module de transmission (jaune) ainsi que celui du module épi (bleue), laissant apparaître une fenêtre spectrale disponible. (b) décrit les mêmes courbes, avec l'ajout en rouge pointillé du spectre d'une LED centrée à 660 nm, couplée à un filtre passe bande centré sur  $\lambda = 676 \pm 30\text{nm}$ .

Avec ces contraintes, on observe alors de manière claire sur (a) de la figure 3.22 qu'il existe une fenêtre spectrale disponible pour le signal de référence qui s'étend de  $\lambda = 660\text{nm}$  à  $\lambda = 680\text{nm}$  environ. La solution qui a été adoptée est représentée au (b), avec l'intensité normalisée d'une LED centrée autour de 660 nm (M680L4 ThorLabs) après avoir traversé un filtre passe-bande centré sur  $\lambda = 676 \pm 30\text{nm}$  (FF01-676/29-25, Semrock). Cette combinaison ainsi choisie permet l'émission du faisceau de référence dans la zone spectrale désirée et a été implémentée en position ① comme indiquée figure 3.20.

**Modification des chemins optiques** La seconde modification, outre logicielle, concerne donc l'ajout du module de référence. Il était alors impératif de repenser les chemins optiques du montage, afin de permettre au faisceau de référence d'atteindre un PMT du module d'épi-détection, sans altérer la détection des autres signaux. Les modifications des chemins optiques que son faisceau emprunte apparaissent en rouge sur le schéma (b) de la figure 3.20.

D'abord, le miroir dichroïque redirigeant les signaux SHG/THG dans le bloc en transmission a dû être changé pour permettre à la référence de le traverser. Pour conserver la redirection des faisceaux SHG/THG, un dichroïque passe-bas réfléchissant les longueurs d'ondes inférieures à  $\lambda = 635\text{nm}$  (Di02-R635 Semrock) a été installé. Après avoir traversé l'échantillon, le signal doit être collecté sur l'un des trois PMT disponibles dans le bloc d'épi-détection. Pour ce faire, nous avons réarrangé les détecteurs pour conserver, en plus de la référence, les canaux rouge et vert : le PMT rouge devient celui de la référence, le PMT vert collecte désormais le rouge, et le PMT bleu collecte le signal vert. Dans la pratique, un premier miroir dichroïque identique à celui du module en transmission sépare les faisceaux incidents autour de  $\lambda = 635\text{nm}$  : le signal de référence est alors collecté par le PMT rouge. Par la suite, un second dichroïque  $\lambda = 560\text{nm}$  sépare les signaux vert et rouge. Enfin, chaque PMT est alors muni d'un filtre passe-bande permettant de filtrer les signaux parasites : FF01-676/29-25, Semrock pour la référence (le même qu'au niveau de la LED), FF01-607/70-25, Semrock pour le rouge, FF01-539/30, Semrock pour le canal vert.

Ainsi, le dispositif nous permet d'acquérir des images avec 4 canaux d'imagerie en simultané, synchronisés avec le signal de référence : fluorescence verte, fluorescence rouge, SHG et THG.

**Signal de modulation par le cœur** La modulation du signal de référence par le cœur est l'enjeu fondamental de l'ajout de ce module. Nous souhaitons obtenir une modulation par le cœur, détectable par le PMT et représentatif de sa contraction. Pour ce faire, nous profitons de la non-homogénéité des structures cardiaques et plus spécifiquement de la réfraction de la lumière par ses tissus.

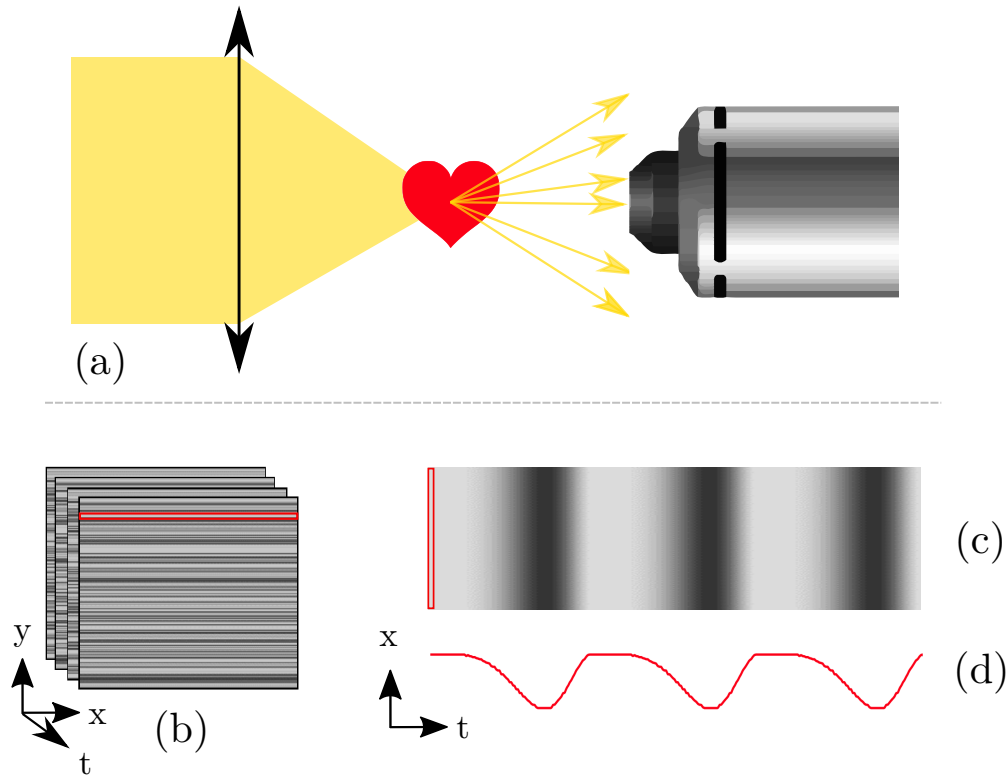


FIGURE 3.23: Principe de la modulation de la référence par le battement cardiaque. (a) décrit la déviation des rayons incidents par les structures du tissu cardiaque. La quantité de lumière déviée jusqu'à l'objectif dépend de la phase de contraction du cœur. (b) correspond à l'image XTY de la référence associée, acquise de manière synchrone avec le signal utile d'imagerie. (c) est le kymogramme d'une ligne de la référence. (d) est la courbe de modulation résultante d'un moyennage sur  $x$  du kymogramme.

Le schéma 3.23 en détaille le principe : lorsque la lumière est focalisée sur le cœur du poisson, ce dernier va dévier une partie des rayons relativement aux propriétés physiques et aux structures des tissus traversés. Ainsi, en se contractant, le cœur modifie sa conformation spatiale et expose de nouvelles structures au faisceau incident, altérant ainsi la manière dont les rayons sont déviés. De fait, certains d'entre eux qui se trouvaient précédemment collectés par l'objectif ne le sont plus, d'autres qui ne l'étaient pas le sont, créant ainsi une différence de signal collecté au cours du cycle cardiaque : c'est ce qui constitue la modulation que nous détectons.

**Éclairage de Köhler** Le module de référence a été conçu pour éclairer l'échantillon avec une illumination de Köhler, afin d'obtenir un éclairage homogène de l'échantillon sur un champ de vue ajustable. La sélection d'une région optimale du cœur est alors plus flexible, ce qui permet ainsi d'obtenir une meilleure modulation du signal. Pour obtenir une telle illumination, trois conditions sont nécessaires :

- Conjuguer le plan de l'échantillon avec un diaphragme, le diaphragme de champ

- Conjuguer le plan de la source avec un diaphragme, le diaphragme d'ouverture
- Conjuguer ce même diaphragme d'ouverture avec la pupille arrière de l'objectif

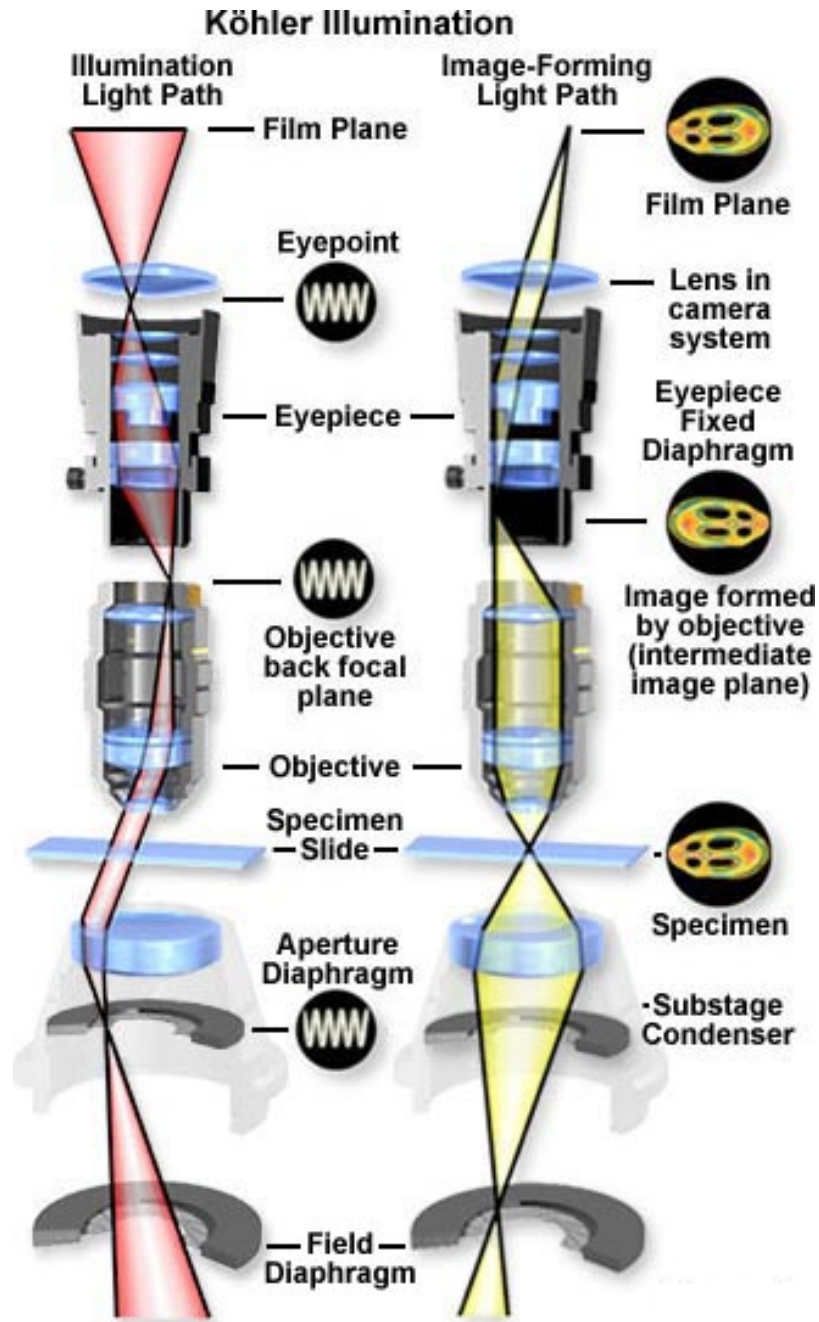


FIGURE 3.24: Principe de l'illumination de Köhler. Tiré de [www.olympus-lifescience.com](http://www.olympus-lifescience.com)

La figure 3.24 détaille ces trois conjugaisons sur un microscope et la succession des optiques nécessaires. Dans le cas du montage commercial (TrimScope) utilisé et présenté au 3.20, nous disposons déjà d'un diaphragme d'ouverture conjugué à la pupille arrière de l'objectif, se trouvant sur le condenseur. Cependant, le condenseur sert avant tout à la collection du signal en transmission SHG et THG, et se doit d'être le plus ouvert possible pour collecter un maximum de photons. Il nous fallait alors pour obtenir une illumination de Köhler, réaliser les deux premières conjugaisons, de même que conjuguer le diaphragme du condenseur avec un nouveau diaphragme d'ouverture. En procédant ainsi, il est possible de le manipuler tout en collectant les photons transmis.

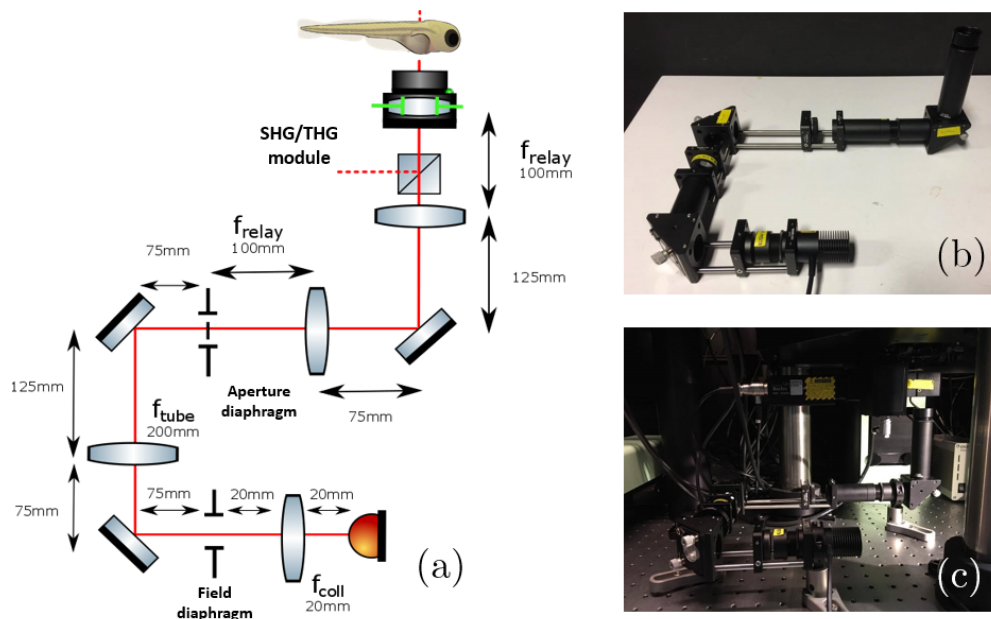


FIGURE 3.25: Montage expérimental du module de référence. Le montage permet d'obtenir un éclairage de Köhler au niveau de l'échantillon et ainsi d'avoir un contrôle indépendant du champ et de l'intensité (uniforme) de l'illumination. (a) Diagramme du montage et des optiques associées. (b) Le module de référence est amovible et peut être retiré pour permettre l'illumination en lumière blanche par le dessous. (c) Le module de référence tel que placé sous le microscope et le module de détection en transmission.

Le dispositif détaillé figure 3.25 répond à ces contraintes techniques. Par ailleurs, la compacité de l'ensemble était un autre enjeu important : le module se devait de tenir sous le microscope mais aussi d'être amovible pour permettre l'utilisation des autres sources d'illumination du montage. Les trois miroirs permettent d'ajuster les angles d'illumination. Certaines distances présentées sur le schéma sont ajustables par vissage/dévisage des tubes optiques les uns par rapport aux autres ; ils permettent ainsi un contrôle précis de chaque conjugaison.

Au plan de l'échantillon, il est à présent possible de régler le champ et l'intensité de l'illumination comme le montre la figure 3.26.

**Invariance du signal de référence aux mouvements en Z** Comme évoqué dans la partie 3.2.2.2, sur notre montage, l'acquisition d'un volume se fait en déplaçant l'objectif d'illumination, solidaire du module d'épi-détection. Ainsi, la platine, le condenseur, le module en transmission et la référence restent quant à eux solidaires entre eux. De fait, les conjugaisons restent fixes : le faisceau de référence éclaire l'échantillon de la même manière tout au long de l'acquisition, comme prouvé par la figure 3.27. En revanche, si le faisceau de référence provenait de l'objectif d'illumination, alors la modulation obtenue serait différente et potentiellement dégradée à chaque plan.

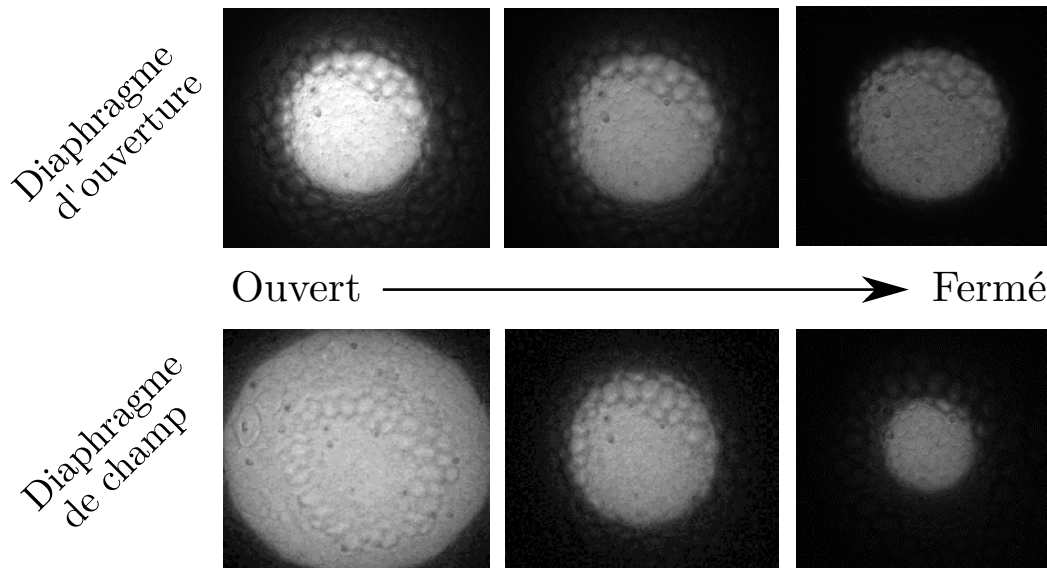


FIGURE 3.26: Influence de la fermeture des diaphragmes de champ et d'ouverture sur l'illumination au plan d'imagerie.

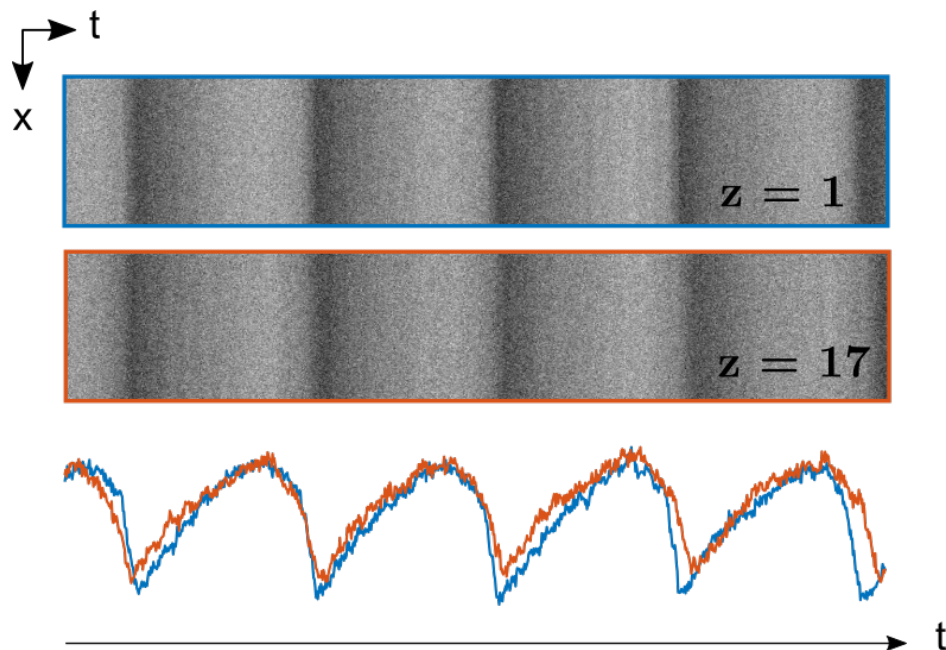


FIGURE 3.27: Preuve de l'invariance du signal de référence aux mouvements  $Z$ . Les deux kymogrammes exposés proviennent d'un même jeu de donnée, du plan  $z = 1$  et  $z = 17$ , pour un  $\delta z = 1.5\mu m$  entre chaque plan, soit  $\Delta z_{1-17} = 24\mu m$ . Le signal de référence est de forme identique comme l'atteste leur profil superposé.

Au bilan de l'implémentation de la référence, la figure 3.27 démontre que nos objectifs ont été atteints : nous disposons d'un signal synchrone avec les signaux de fluorescence et d'harmoniques qui est modulé de manière robuste et invariante tout au long de l'acquisition par le coeur, sans pour autant compromettre le fonctionnement normal du microscope.

### 3.2.3 Paramètres d'acquisition

#### 3.2.3.1 Paramètres d'imagerie

L'imagerie biologique est souvent l'affaire de compromis. Comme évoqué en introduction par la figure 1.9 de la "Pyramide de la frustration", il est nécessaire de cibler ses besoins afin d'orienter les paramètres d'imagerie selon une des directions privilégiées : la résolution spatiale, la résolution temporelle, le RSB et surtout l'intégrité de l'échantillon biologique observé.

Cependant, le **mode d'acquisition XTYZ** offre un **sommet supplémentaire à cette pyramide** : il est possible de reporter les limitations sur ces quatre piliers fondamentaux, vers un cinquième, spécifique à cette stratégie : **la durée de l'acquisition** (figure 3.28). En effet, grâce à l'utilisation du signal de plusieurs cycles cardiaques pour la reconstruction d'une image, allonger la durée d'acquisition totale permet d'ajouter un degré de liberté au problème. Naturellement et comme toujours, cette astuce rencontre certaines limites que nous discuterons ci-dessous.

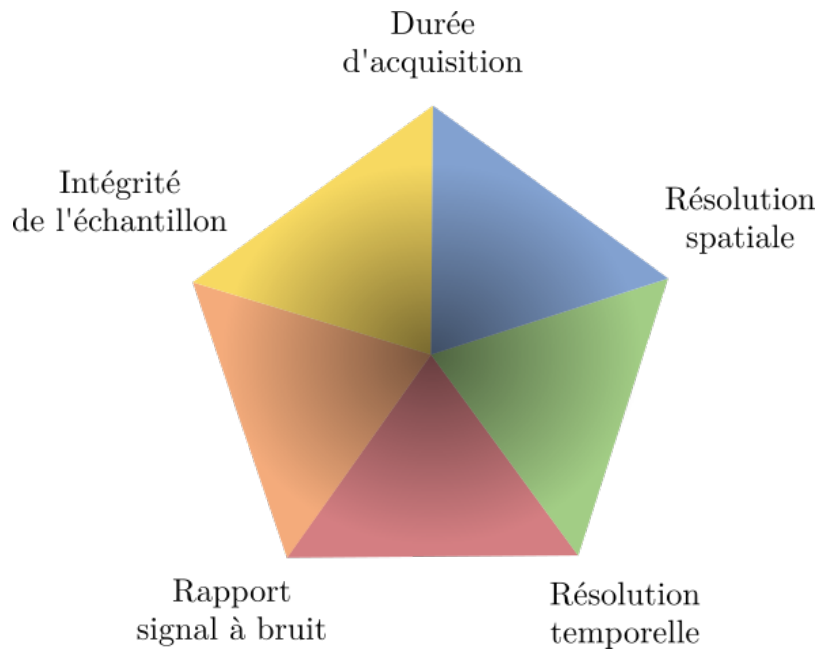


FIGURE 3.28: Illustration des compromis à effectuer dans le cadre de l'imagerie XTYZ. Un sommet supplémentaire correspondant à la durée d'acquisition permet d'assouplir les contraintes des compromis à réaliser lors de l'imagerie *in vivo* d'échantillons biologiques. Désormais désignée comme pyramide de la frustration à base pentagonale.

Dans la suite, nous décrivons les paramètres d'acquisition utiles à l'imagerie XTYZ. Il s'agira d'en discuter les objectifs, leur pertinence, ainsi que de donner les valeurs typiques de nos acquisitions.

**Taille des images** La taille des images en pixels est un paramètre déterminant pour les acquisitions XTYZ. En effet, le balayage du volume commence par la direction X, puis T, puis Y et Z. Ainsi, étendre le nombre de pixels dans une dimension, ce qui revient à élargir le champ de vue ou améliorer l'échantillonnage spatial, se répercute nécessairement négativement sur les autres paramètres d'imagerie. Typiquement, les volumes (xyz) que nous acquérons sont de l'ordre de 400x300x10 voxels, mais l'on peut ponctuellement atteindre des dimensions allant jusqu'à 500x500x20 voxels sous certaines conditions.



À vitesse de balayage constante, étendre l'image dans la direction X revient à réduire le temps passé par pixel et donc le nombre de photons collectés. Étendre l'image de  $n$  pixels à  $n'$  pixels dans la direction Y ou Z aura pour effet d'augmenter directement le temps d'acquisition d'un facteur  $k = \frac{n'}{n}$ . Dans l'exemple d'un jeu de données de dimension 300x200x10 voxels que l'on souhaite étendre à 300x300x10 voxels, la durée d'acquisition sera prolongée d'un facteur :

$$k = \frac{n'}{n} = \frac{300}{200} = 1.5 \quad (3.4)$$

Pour de gros jeux de données, la durée d'acquisition est souvent limitante comme détaillé dans un paragraphe suivant. Ainsi, on essaiera de placer l'échantillon de manière à ce que l'étendue spatiale la plus grande soit dans la direction X, et ainsi limiter le nombre de pixels en Y ou de plans en Z.

**Résolution spatiale** La résolution spatiale quantifie la capacité d'un système à résoudre des structures proches spatialement. Lors de l'imagerie d'un phénomène dynamique, elle est intimement liée à la résolution temporelle dont nous avons détaillé les aspects précédemment (1.3.1). Dans ce projet, nous cherchons à conserver la résolution spatiale accessible du microscope, sans que celle-ci soit compromise par un mauvais échantillonnage temporel. Le microscope commercial TriMScope utilisé dans ce projet a par ailleurs servi à l'étude de nanoparticules en SHG, par Mahou et al. [49], publication dans laquelle la résolution spatiale a été caractérisée, théoriquement, mais aussi expérimentalement. Le microscope est muni d'un objectif Olympus XLPLN25 × WMP, de grossissement x25 et d'une ouverture numérique de 1.05. Nous pouvons à partir de ces données techniques, calculer les résolutions axiales et latérales, par les formules définies dans Zipfel et al. [19]. Pour une ouverture numérique NA supérieure à 0.7 et un indice  $n$ , nous avons une estimation de la largeur du faisceau au point focal (*waist* en anglais, largeur à 1/e) définie par ces deux relations :

$$\omega_{xy} = \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2}NA^{0.91}} \quad \text{et} \quad \omega_z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[ \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] \quad (3.5)$$

Les résolutions axiales et latérales sont alors linéairement dépendantes de la longueur d'onde  $\lambda$ . Théoriquement, on calcule pour un  $\lambda = 950$  nm des valeurs de largeur à mi-hauteur de la tâche de diffraction de  $\delta_Z = 1.16$   $\mu\text{m}$  en Z, et de  $\delta_{XY} = 0.20$   $\mu\text{m}$  en XY. Expérimentalement et comme caractérisé par Mahou et al. [49] sur le TriMScope, à 950 nm on trouve alors une résolution latérale de  $\delta_Z = 1.29 \pm 0.14$   $\mu\text{m}$  et  $\delta_Z = 0.44 \pm 0.07$   $\mu\text{m}$ . Ces valeurs sont alors à considérer pour proposer un échantillonnage spatial cohérent de nos acquisitions.

**Échantillonnage spatial** La résolution spatiale n'est pas à confondre avec l'échantillonnage spatial : quand le premier définit une caractéristique intrinsèque du système, le second est un paramètre d'imagerie qu'il faut déterminer avec attention afin de garantir la bonne reconstruction des images acquises par la méthode XTYZ. Dans la majeure partie des cas, on souhaite tirer au maximum profit de la résolution spatiale dont on dispose. À cet égard, le théorème d'échantillonnage (ou théorème de Nyquist-Shannon) nous indique qu'aucun gain n'est à tirer d'échantillonner plus fréquemment que deux fois la fréquence maximale résolue par le système (fréquence de Nyquist). Typiquement, on utilise un échantillonnage de 0.3  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  en XY, et de environ 1  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  en Z. Dans le cas de l'imagerie XTYZ, en particulier de la synchronisation par maximum de correspondance, il est important que les lignes adjacentes soient spatialement très corrélées pour permettre une bonne synchronisation de ces dernières. Ainsi, le suréchantillonnage se justifie dans le cadre de nos acquisitions. Autant que possible, les images seront acquises avec un échantillonnage spatial supérieur à la fréquence de Nyquist, à la fois en axial et en latéral. Il faut cependant rappeler qu'augmenter la fréquence d'échantillonnage à taille d'image constante, revient à faire des compromis sur

d'autres aspects de l'imagerie, comme la durée d'acquisition ou le RSB de l'image (figure 3.28)

**Champ de vue** Le champ de vue  $(X, Y, Z)$  en  $\mu\text{m}$  est alors le produit du nombre de pixels  $n_{X, Y, Z}$  d'une dimension et son échantillonnage  $\Delta_{X, Y, Z}$  dans cette même dimension. Pour reprendre les valeurs typiques données précédemment, on arrive alors à une taille d'image caractéristique de :

$$(X, Y, Z) = (n_X \Delta_X, n_Y \Delta_Y, n_Z \Delta_Z) = (400 \times 0.3, 300 \times 0.3, 10 \times 1) = (120, 90, 10) \mu\text{m} \quad (3.6)$$

Pour rappel, un cœur de poisson-zèbre à 3 jours post-fertilisation mesure environ 100 à 150  $\mu\text{m}$  pour sa dimension la plus grande [50]. Ainsi, ces valeurs de champ de vue sont alors pertinentes pour capturer une large partie du battement cardiaque.

**Vitesse de balayage en ligne** Comme largement détaillé dans la section précédente, la vitesse de balayage est un paramètre fondamental de l'imagerie XTYZ : l'échantillonnage temporel des lignes deviendra aussi celui du volume, après reconstruction. Aussi, il est important de balayer chaque ligne en X rapidement. Cependant, la vitesse d'imagerie se fait au détriment du signal : à nombre de pixels constant en X, augmenter la vitesse d'imagerie signifie réduire le temps passé sur chaque voxel du volume.

Dans le cas de la fluorescence, le signal est fort et la vitesse de balayage n'est pas limitée par celui-ci. Nous avons ainsi pu utiliser la vitesse maximale du système de balayage du microscope, c'est-à-dire 1200 lignes par seconde (Hz). Par contre, pour les signaux cohérents comme la SHG dont le signal collecté est plus faible, nous avons ajusté la vitesse de balayage pour conserver un bon RSB. Les ordres de grandeurs caractéristiques sont alors plutôt de 800-1000 Hz. Pour le reste, le choix de la vitesse de balayage qui correspondra alors à la résolution temporelle de l'image, dépend également de la vitesse des structures à imager.

**Temps passé par pixel** Le temps passé par pixel  $t_{\text{dwell}}$  conditionne le rapport signal à bruit (RSB) de l'image acquise. En effet, lorsque le laser balaie les pixels, il illumine pendant quelques microsecondes un volume élémentaire  $\delta V$ . L'excitation laser va alors générer un signal de fluorescence ou de SHG/THG dépendamment des structures éclairées. Les photons ainsi émis sont collectés par un PMT : la valeur du pixel dépend alors du nombre de photons atteignant le capteur durant le temps  $t_{\text{dwell}}$  de la collection. Il est à rappeler que les images sont obtenues grâce la détection de seulement quelques photons par pixels, ensuite amplifiés par les PMT. Ainsi, allonger la durée d'exposition d'un pixel aura comme effet de réduire la contribution du bruit par rapport au signal utile, améliorant alors le RSB du pixel, et donc de l'image. Les valeurs du temps passé par pixel peuvent varier assez drastiquement d'une image à l'autre : il peut être très court pour une image très étendue en X, balayée rapidement, et relativement long pour une image étroite balayée lentement. Cependant, le calcul du temps passé par pixel n'est pas, comme on pourrait le penser intuitivement, le rapport du temps s'écoulant entre deux lignes  $\Delta t_{\text{line}} = \frac{1}{f_{\text{scan}}}$  et le nombre de pixels en X noté  $n_X$ . Dans la pratique, la totalité du temps écoulé entre deux lignes n'est pas passée à illuminer l'échantillon : il faut ajouter à cela le temps du retour du faisceau de balayage, ainsi que les non-linéarités associées au mouvement des miroirs galvanométriques.

Le temps passé sur chaque pixel est alors calculé en interne par le logiciel de LaVision, Inspector et est conservé dans les métadonnées des images. Pour un jeu de données étendu en X balayé rapidement, les valeurs typiques sont de l'ordre de 1.5  $\mu\text{s}$  (500 pixels en X, 1200Hz). À l'autre extrême, on peut s'attarder jusqu'à 5  $\mu\text{s}$  sur chaque pixel de l'image (200 pixels en X, 600 Hz). Notons que ces valeurs sont typiques des acquisitions en microscopie multiphotons point par point et sont suffisantes à la détection de signaux faibles. Les images obtenues par

l'imagerie XTYZ permet alors d'atteindre de très hautes résolutions temporelles sans pour autant compromettre le temps passé sur chaque pixel. Ce point sera détaillé à la section résultats 3.3.1.

**Nombre de balayages par ligne** Ce paramètre est spécifique aux acquisitions XTYZ : il correspond au nombre de passages sur la même ligne X avant de passer à la suivante (en Y).

Pour en choisir un nombre pertinent, il est important de rappeler deux choses : le cœur du poisson-zèbre bat à une fréquence de 2 à 4 Hz, et nous avons besoin de quelques cycles pour permettre la reconstruction des images XTYZ. Ainsi, un nombre cohérent de passages est celui qui permet de rester sur une même ligne durant quelques cycles. Dans l'exemple où nous souhaitons  $N_{\text{cycles}} = 6$  cycles d'un cœur qui bat à  $f_{\text{cœur}} = 4$  Hz, il faut rester 1.5 secondes sur une même ligne.

Alors, pour déduire le nombre de balayage  $N_{\text{balayage}}$  nécessaires, il faut considérer le temps  $\Delta T_{\text{ligne}}$  s'écoulant entre deux lignes. Cette valeur est directement reliée à la fréquence d'imagerie  $f_{\text{ligne}} = \frac{1}{\Delta T_{\text{ligne}}}$ . Finalement, et dans l'exemple où  $f_{\text{ligne}} = 1200$  Hz, le nombre de balayages se détermine par la relation :

$$N_{\text{balayage}} = \frac{N_{\text{cycles}} \times f_{\text{ligne}}}{f_{\text{cœur}}} = 1800 \quad (3.7)$$

**Longueurs d'onde** Sur notre montage, nous avons à notre disposition deux lignes laser : le Mai Tai HP DeepSee,  $\lambda = 690 - 1040$ nm, Spectraphysics and l'Insight DeepSee,  $\lambda = 690 - 1300$ nm, Spectra Physics, comme décrit au 3.2.2.1. De fait, nous disposons d'une grande liberté dans le choix des longueurs d'onde excitatrices. Le choix de celles-ci demeure cependant un critère important et doit se conformer à trois impératifs : exciter les fluorophores ou générer les signaux cohérents (SHG/THG), pénétrer profond dans le tissu sans détériorer le signal, et limiter les dégâts phototoxiques portés à l'échantillon.

En raison de la faible intensité des signaux cohérents SHG/THG, le choix de la longueur d'onde sera fera en priorité en vue d'optimiser ces processus. Comme présenté en 1.14, la SHG et la THG peuvent s'obtenir à toutes les longueurs d'onde si les conditions sur le milieu l'autorisent. Cependant, si l'on veut imager profond dans les tissus, il faut alors utiliser les longueurs d'ondes élevées, dans l'infrarouge. Cependant, la résolution se dégrade lorsqu'on augmente la longueur d'onde comme vu au paragraphe de la résolution spatiale. Par ailleurs, et comme l'indiquent les courbes d'absorption des différents éléments constitutifs des tissus présentées à la figure 1.11, les longueurs d'ondes supérieures au micron sont plus susceptibles d'être absorbées par l'eau. Ainsi, pour limiter le problème d'échauffement, deux longueurs d'ondes sont à privilégier, au niveau des creux d'absorption de l'eau : pour la SHG seule, 900 nm et 1090 nm permettent détection par le bloc de transmission à respectivement 450 et 545 nm. Si en revanche on souhaite obtenir également du signal THG, il faut alors se placer plus haut dans le spectre et atteindre 1150 nm. Dans cette configuration, on collecte la SHG et la THG dans le bloc de transmission à respectivement 575 nm et 380 nm.

Par ailleurs, et comme il sera détaillé dans la partie 3.2.3.2, nous utilisons le signal de fluorescence provenant de différents embryons mutants et transgéniques, qui expriment des fluorophores dont le spectre couvrent une bonne partie du visible. Le choix des longueurs d'onde excitatrices de fluorescence se fait donc en fonction des fluorophores à exciter, en respectant les contraintes du chemin optiques établies en 3.2.2.2. Les spectres d'excitation 2-photon pour les principaux fluorophores sont référencés par Drobizhev et al. dans [51]. Il est à noter qu'ils ne correspondent pas au spectre d'émission à 1-photon doublé en longueur d'onde. Les principales protéines fluorescentes utilisées sont la **mCherry** (excitation entre

1050 et 1200 nm), la **EGFP** (excitation entre 800 et 1000 nm) et la **Citrine** (excitation entre 850 et 1050 nm). Ainsi, pour nos acquisitions, on peut identifier plusieurs cas typiques d'association SHG/THG et fluorescence, pour lesquelles il est possible de générer plusieurs signaux à partir d'un même faisceau excitateur. Parmi ces configurations, on peut citer :

- **SHG + mCherry** : une seule ligne laser (Insight) à  $\lambda = 1090\text{nm}$
- **SHG + EGFP/Citrine** : une seule ligne laser (MaiTai) à  $\lambda = 900\text{nm}$
- **SHG + THG + mCherry** : une seule ligne laser (Insight) à  $\lambda = 1150\text{nm}$
- **SHG + THG + mCherry + EGFP/Citrine** : deux lignes laser (MaiTai) à  $\lambda = 900\text{nm}$  et (Insight) à  $\lambda = 1150\text{nm}$ . Détection SHG et THG à respectivement 575 et 380 nm.

**Gain des PMT** Le microscope utilise des PMT comme détecteurs. Ce sont des dispositifs très sensibles permettant la détection de lumière jusqu'aux photons individuels. Lorsqu'un photon percute la surface du PMT, un électron peut se détacher du métal par effet photo-électrique. Cet électron va alors être amplifié par une succession de dynodes, par effet d'avalanche. En résulte un courant électrique dont l'intensité dépend de l'amplification, ou gain  $G_{\text{PMT}}$  du PMT.

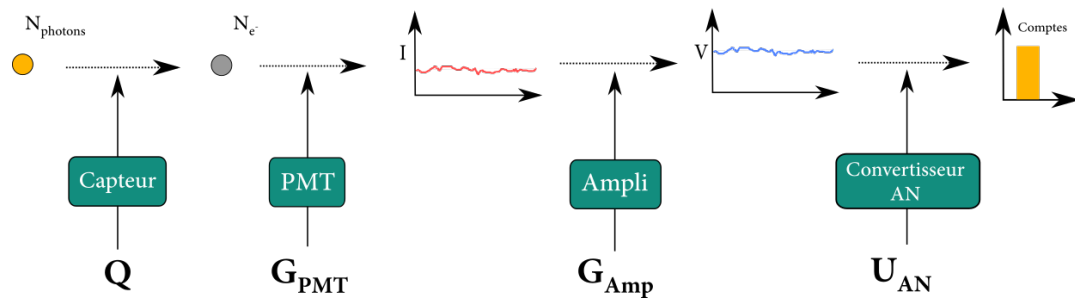


FIGURE 3.29: Schéma explicatif de la conversion comptes/photons du TriMscope. Les photons qui frappent le capteur génèrent un flux d'électrons, qui est ensuite amplifié par le PMT. Une étape supplémentaire d'amplification convertit le courant en tension, avant d'être transformé numériquement en "comptes" et affiché par le logiciel Impector.

Sur le logiciel Impector, nous n'avons pas accès directement au nombre de photons collectés. Le logiciel nous affiche un nombre de "comptes", qui dépend de trois paramètres, associées à plusieurs étapes de conversion successives décrites figures 3.29. Ces paramètres sont, dans l'ordre :

- Le gain  $G_{\text{PMT}}$  du PMT, permettant l'amplification du courant en sortie du PMT à partir des électrons arrachés.  $1.0 \times 10^5 < G_{\text{PMT}} < 1.2 \times 10^6$
- Le gain  $G_{\text{Amp}}$  d'amplification, correspondant à une conversion intensité/tension après le PMT.  $G_{\text{PMT}} = 350\text{ V/A}$
- La conversion analogique-numérique, qui convertit la tension en "comptes". La valeur correspondante pour un "compte" est :  $1\text{ct} = 122\ \mu\text{V} = U_{\text{AN}}$

Ainsi, le nombre de comptes est lié à l'intensité  $I$  en sortie du PMT par l'équation suivante :

$$\text{cts} = \frac{G_{\text{Amp}} \times I_{\text{PMT}}}{U_{\text{AN}}} \quad (3.8)$$

Or,  $I_{\text{PMT}}$  dépend du gain  $G_{\text{PMT}}$ , du temps d'intégration  $\Delta t$ , de l'efficacité quantique  $Q$  (dépend de la longueur d'onde), de la charge de l'électron  $e$  et naturellement du nombre de photons  $N$  collectés. Ils sont reliés par la relation suivante :

$$I_{\text{PMT}} = \frac{Q \times G_{\text{PMT}} \times e}{\Delta t} \times N \quad (3.9)$$

En couplant alors ces deux relations, on en vient à une relation linéaire entre les comptes et le nombre de photons :

$$\text{cts} = \frac{G_{\text{Amp}} \times Q \times G_{\text{PMT}} \times e}{\Delta t \times U_{\text{AN}}} \times N = K(G_{\text{PMT}}) \times N \quad (3.10)$$

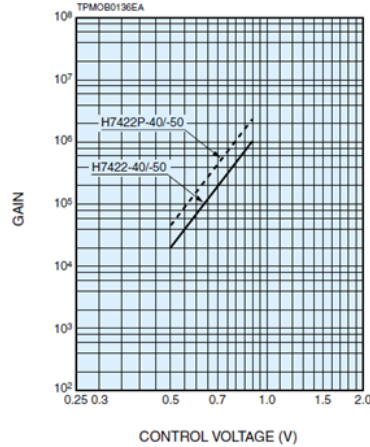


FIGURE 3.30: Contrôle du gain des PMT en fonction de la tension appliquée, pour les détecteurs de la gamme H7422 d'Hamamatsu. Le contrôle de la tension se fait par le biais du logiciel Inspector, grâce à un curseur réglable entre 0 et 100%.

Cependant, le logiciel Inspector nous permet de modifier la valeur du gain, grâce à un curseur entre 0 et 100%, correspondant à la plage  $1.0 \times 10^5 < G_{\text{PMT}} < 1.2 \times 10^6$ . Déplacer le curseur modifie alors le voltage appliqué au PMT et module ainsi le gain, comme présenté figure 3.30. On peut ainsi modifier la correspondance entre nombre de photons collectés et nombre de "comptes" par un facteur 10 environ. En ordre de grandeur, on peut prendre comme valeurs typiques :  $e = 1.6 \times 10^{-19}$ ,  $Q = 0.35$ ,  $\Delta t = 2ns$ , et un gain  $G_{\text{PMT}}$  correspondant à 50% du curseur soit  $G_{\text{PMT}} \approx 5 \times 10^5$ . L'application numérique devient alors, en grandeur typique :

$$\text{cts} = K(G_{\text{PMT}}) \times N = 37.6 \times N \quad (3.11)$$

En pratique, le signal de référence est très intense : pour des diaphragmes de champ et d'ouverture fermés au maximum, un réglage du gain  $G_{\text{PMT}}$  de 30% est en général suffisant. Pour la fluorescence, il est d'usage d'utiliser des valeurs de gain jusqu'à 80% : au delà, la réponse du détecteur n'est plus linéaire et devient plus sensible au bruit. Pour la SHG/THG, on se place quasi-systématiquement à un gain maximal de 80% en raison de la faible intensité des signaux collectés.

**Durée des acquisitions** La durée des acquisitions constitue un dernier paramètre important, en particulier pour le mode d'acquisition XTYZ. En effet, les méthodes classiques ne peuvent tirer avantage du fait d'allonger le temps d'acquisition, ce dernier étant uniquement déterminé par le nombre de voxels et la vitesse à laquelle on les parcourt. Lors de l'imagerie de processus périodiques cependant, il est possible de collecter le signal provenant de plusieurs cycles au sein d'une même image. La technique permet alors de "diluer" l'acquisition sur plusieurs cycles, et d'alléger les contraintes sur les paramètres définis plus tôt.

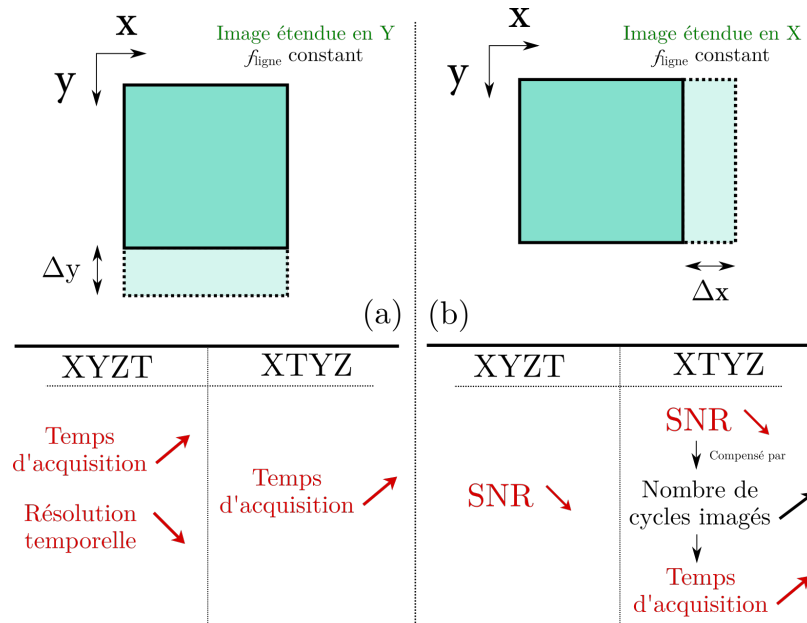


FIGURE 3.31: Effet de l'extension des images sur les paramètres d'acquisition, à fréquence de balayage des lignes constante. (a) Dans le cas d'une extension dans la dimension Y, les images acquises en XYZT perdent en résolution temporelle et durent plus longtemps. Celle en XTYZ ne souffrent pas de la baisse de résolution mais voient leur temps d'acquisition s'allonger. Le résultat est identique pour la dimension Z. (b) Dans le cas d'une extension dans la dimension X, et à fréquence de balayage des lignes constante, on passe donc moins de temps sur chaque voxel. Pour les deux types d'acquisition, cela se caractérise par une baisse du RSB. Le mode d'acquisition XTYZ permet de compenser ce phénomène en collectant plus de cycles cardiaques par ligne. Le temps d'acquisition se prolonge alors avec le nombre de cycles supplémentaires par ligne.

Pour s'en convaincre, comparons les acquisitions XYZT et XTYZ lorsqu'on étend une image en X ou en Y (la dimension Z est ici équivalente à Y), à **fréquence de balayage des lignes  $f_{\text{ligne}}$  constante**. Les cas sont illustrés figure 3.31.

Par l'approche classique XYZT, augmenter la taille de l'image en Y est synonyme de dégradation de la résolution temporelle. En effet, le temps entre deux images sera d'autant plus long qu'il y a de pixels supplémentaires à balayer. Avec le mode XTYZ, l'échantillonnage temporel ne dépend pas de Y ou Z. L'ajout de pixels (en Y ou Z indépendamment) n'a strictement aucune autre influence sur l'acquisition que d'allonger le temps total d'imagerie.

Dans la direction X, augmenter la taille de l'image provoque nécessairement une baisse de RSB, pour les deux modes d'acquisition. Dans ce cas, le faisceau passe toujours autant de temps sur chaque ligne ( $f_{\text{ligne}}$  constante) mais doit balayer plus de pixels. On diminue ainsi le temps que passe le laser sur chacun d'entre eux, et donc nombre de photons collecté par pixel, ce qui dégrade le RSB de l'image. La méthode d'acquisition XTYZ peut alors contourner ce problème en balayant les lignes sur un nombre plus important de cycles afin de compenser les photons qui n'ont pas pu être collectés en un seul passage. Cela se fait alors au détriment de la durée de l'acquisition : si l'on double le nombre de passages sur une ligne, cela signifie qu'on s'y s'attarde deux fois plus longtemps avant de passer à la suivante. On double alors le temps d'acquisition. De ce fait, le compromis peut être repoussé sur la durée de l'acquisition. C'est ainsi que ce paramètre devient l'un des principaux problèmes au mode XTYZ : **les acquisitions peuvent durer très longtemps**. Dans des cas typiques d'acquisition de volumes (xyzt), elles peuvent durer jusqu'à plusieurs dizaines de minutes : ce sont alors des échelles de temps comparables à celles du développement du poisson-zèbre. La morphogénèse

peut alors causer des mouvements des structures embryonnaires entre le début et la fin de l'acquisition.

Prenons notre exemple caractéristique d'un cœur battant à  $f_{\text{cœur}} = 4 \text{ Hz}$ , dont on veut faire une image de  $(n_X, n_Y, n_Z) = 300 \times 200 \times 10$  voxels à  $f_{\text{balayage}} = 1200 \text{ Hz}$ . On décide de collecter 4 périodes par cycle, soit un temps passé par ligne de  $\Delta T_{\text{ligne}} = 1 \text{ s}$ . Le temps d'acquisition est alors le produit du nombre de lignes à balayer par le temps par le passé par ligne :

$$t_{\text{acquisition}} = n_Y \times n_Z \times \Delta T_{\text{ligne}} = 4000 \text{ s} \approx 66 \text{ min} \quad (3.12)$$

Pour les acquisitions de volume (xyzt), on essayera ainsi de réduire le problème dimensionnellement pour limiter le temps d'acquisition. Les problèmes inhérents à de telles durées d'acquisition seront discutés dans la partie 3.4.

### 3.2.3.2 Échantillons biologiques

Au-delà de l'aspect technique du microscope, les échantillons biologiques et la manière dont ils sont préparés conditionnent nettement la qualité des images obtenues. Dans cette sous-section, nous détaillerons les différents marquages des embryons utilisés, leur montage sous le microscope, ainsi que les protocoles associés à leur préparation. Nos expériences ont été conduites sur des embryons de poisson-zèbres (*Danio rerio*) entre 3 et 5 jours après fertilisation (*Days Post Fertilization*, dpf), dont la plupart sont issus de lignées transgènes pour l'expression de protéines fluorescentes.

**Marquages** Ci-dessous, la liste des marquages utilisés à l'étude dynamique du cœur :

- Tg(actb2 :Mmu.Arl13b-GFP) [52]
- Tg(fli1ep :Lifeact-EGFP);Tg(kdr-l :ras-Cherry) [53]
- H2b-mCherry [54]
- Gt(desma-citrine)ct122a et Gt(desma-citrine)ct122a [55]

**Montage de l'échantillon** L'étude de phénomène biologiques *in vivo* impose un certain nombre de contraintes sur le montage des échantillons biologiques eux-mêmes. Parmi ceux-ci, préserver l'intégrité de l'échantillon durant toute la durée de l'acquisition est une priorité absolue. Par ailleurs, réussir à présenter les structures à acquérir au microscope, de manière à en tirer la meilleure image est un défi complexe. Ainsi, le montage de l'échantillon est une étape qu'il convient d'approcher avec réflexion et minutie, tant elle est cruciale à l'obtention d'une image biologiquement pertinente.

Il existe trois enjeux importants à considérer lors du montage de l'échantillon. Le premier est préserver l'embryon dans un état de fonctionnement physiologique, et a fortiori de ne pas lui causer de dommages. Le second est d'orienter astucieusement l'embryon de telle sorte à ce que le faisceau exciteur et de collection aient à traverser un minimum de tissus, tout en révélant les structures intéressantes à l'imagerie. Le dernier est de maintenir l'échantillon dans cette position tout au long de l'acquisition, sans que celui-ci ne bouge ou ne se déplace dans le champ de vue. Là encore, il est question de compromis. La figure 3.2 représente le cœur embryonnaire du poisson-zèbre entre 5 hpf et 5 dpf. On comprend alors que l'orientation du montage dépend de deux facteurs : le stade de développement de l'embryon, ainsi que la chambre que l'on souhaite imager. En effet, on observe sur la figure 3.2 que le cœur se présente d'abord sous la forme d'un tube, qui à partir de 30 hpf se transforme progressivement en deux chambres distinctes : le ventricule et l'atrium [56]. Ces deux chambres vont alors progressivement se déplacer relativement l'une par rapport à l'autre, mais aussi par rapport

à la tête de l'embryon. Aux alentours de 36 hpf, l'atrium est légèrement plus en surface sur le côté gauche de l'embryon, quand le ventricule est niché plus profondément à sa droite. À mesure de leur développement, les deux chambres vont s'aligner symétriquement à l'axe antéro-postérieur, dans un plan perpendiculaire à l'axe dorso-ventral.

À 5 dpf, le cœur se trouve donc assez détaché du reste de l'embryon. Dans une géométrie d'illumination verticale, les orientations latérales de l'embryon s'avèrent être celles qui permettent de traverser le moins de tissu. Lorsque placé sur son côté droit, on expose l'atrium au faisceau excitateur. Lorsque l'embryon est placé sur son côté gauche, on expose le ventricule. Dans la pratique, pour des embryons à 4 dpf, l'atrium protubère toujours légèrement en surface : dans ces conditions, on privilégie une orientation de trois-quarts afin d'éviter que faisceau ne traverse les deux cavités. Pour être montés, les embryons sont d'abord placés dans une solution de tricaine pour permettre leur anesthésie [57; 58]. On dépose ensuite un dôme d'agarose LMP liquide (*Low Melting Point*) de concentration 1.5%, dans une boîte de pétri dont le fond est une lame de verre de 0.17mm d'épaisseur (Glass Bottom Dishes, société MatTek), afin d'en optimiser l'imagerie. On y dépose alors quelques embryons anesthésiés, en prenant soin d'ajouter un minimum de liquide pour ne pas diluer l'agarose. À l'issue de cette opération, on dispose de quelques secondes pour placer les quelques embryons selon l'orientation d'imagerie désirée, à l'aide de forceps. Naturellement, les embryons ont tendance à s'orienter sur le ventre à cause du sac vitellin s'affaissant dans le liquide. Une fois le gel d'agarose solidifié, on remplit la boîte de pétri de la solution de tricaine afin de prolonger l'anesthésie des embryons. Il est également utile d'ôter le surplus d'agarose en surface du dôme : cela permet à l'objectif du microscope de s'approcher au plus près des embryons sans heurter le gel.

### Protocoles

#### Préparation d'une solution de tricaine méthanesulfonate (MS-222) à 0.016% :

La tricaine est à ces doses, un anesthésiant réversible. Il nous permet d'imager les embryons dans des conditions physiologiques, *in vivo*, sans qu'ils ne bougent.

1. Préparation d'une solution stock de 0.4% de tricaine :
  - (a) Mélanger 800 mg de tricaine (Sigma, Cat. # A-5040) dissoute dans 196 ml de eau du milieu de culture embryonnaire et 4 ml de tampon Tris (pH 9).
  - (b) Ajuster le pH à 7 à l'aide de solutions de NaOH ou de HCl.
  - (c) Verser dans des tubes Falcon de 50 ml recouverts d'une feuille d'aluminium (la tricaine se dégrade à la lumière).
  - (d) Conserver les tubes de 50 ml au congélateur. N'en conserver que de petites quantités : la tricaine se dégrade rapidement.
2. Préparation de la solution à 0.016% pour le montage des embryons :
  - (a) Mélanger 4ml de solution mère dans 100ml de milieu embryonnaire.
  - (b) Conserver la solution au réfrigérateur.

#### Préparation d'une solution d'agarose à bas point de fusion (LMP) à 1.5% :

L'agarose sert à immobiliser les embryons anesthésiés dans une position et une orientation spécifique. Liquide au delà de 37°C, il se transforme rapidement en un gel rigide et poreux en dessous de cette température.

1. Ajouter 1.5g de poudre dans 98.5 ml de milieu embryonnaire.
2. Chauffer au micro-ondes, jusqu'à ce que le mélange soit homogène.
3. Conserver l'agarose LMP liquide dans l'incubateur à 40°C.



**Préparation d'une solution de 0.003% PTU (1-phenyl 2-thiourea) :**

La solution de PTU est utile à empêcher la formation des pigments et ainsi rendre les embryons transparents. Les embryons doivent être placés dans la solution de PTU avant le début de leur formation, avant 24 hpf de développement [59].

1. Préparation d'une solution mère de PTU 20x (0,06 %) :
  - (a) Ajouter 60 mg de PTU dans 100 ml de milieu embryonnaire.
  - (b) Mélanger 2,5 ml de solution mère dans 50 ml de milieu embryonnaire.
  - (c) Conserver la solution mère à 28°C.
2. Préparation de la solution de PTU à 0,003% :
  - (a) Mélanger 4ml de solution mère dans 100ml de milieu embryonnaire.
  - (b) Conserver la solution au réfrigérateur.
3. Traitement des embryons avec la solution de PTU à 0.003% :
  - (a) Placer les embryons dans la solution entre 6/8 hpf et 24 hpf.
  - (b) Conserver les embryons dans la solution à 0,003% PTU jusqu'à 5 dpf.

**Préparation d'une solution de 50 mM de BDM (2,3-butanedione-2-monoxime) :**

Le BDM est un agent de découplage du lien excitation-contraction cardiaque. Cette substance permet d'arrêter la contraction du cœur sans autres effets physiologiques sur celui-ci. L'arrêt complet du cœur est utile à l'imagerie statique des structures cardiaques, sur de grands volumes notamment.

1. Préparation d'une solution mère de BDM 1 M :
  - (a) Mélanger 1g de BDM (Sigma-Aldrich112135) dans 10 mL d'eau purifiée
  - (b) Séparer en flacons individuels
  - (c) Conserver à -20°C
2. Préparer 10 ml de solution de BDM 50 mM en milieu embryonnaire pour l'arrêt du cœur :
  - (a) Mélanger 500 µl de solution mère de 1M BDM avec 10 ml de milieu embryonnaire.
  - (b) Ajuster le pH à 7,2
  - (c) Protéger de la lumière si la solution n'est pas utilisée immédiatement
  - (d) Ajouter directement sur le dôme d'agarose contenant les embryons

### 3.2.4 Implémentation de la reconstruction XTY

Cette section décrit l'implémentation et la programmation de l'algorithme de reconstruction des images XTYZ, à partir des images brutes aux lignes décorréées issues des acquisitions décrites précédemment. En entrée, les images se trouvent au format classique de bio-imagerie, sous l'extension .ome.tiff. Ces images (xy) sont annotées selon les 3 autres dimensions typiques à l'imagerie biologique auxquelles elles correspondent dans l'image : le plan Z, les différents canaux, et le temps. Tout le processus de la synchronisation a été réalisé au moyen du logiciel MATLAB, et à partir des données brutes en sortie du microscope ensuite chargées dans le logiciel. Son objectif est de transformer le jeu de données .ome.tiff, interprété par MATLAB comme une succession de plans (xy) désordonnés (annotés en z, temps ou canal), en un jeu de données 5D reconstruit. La chaîne de traitement se décompose en cinq étapes complémentaires et séquentielles, dont tous les éléments essentiels sont décrits par la figure 3.32. L'intégralité de la chaîne de travail est automatisée, à l'exception de l'étape 4 de synchronisation par maximisation de correspondance, qui peut requérir un ajustement manuel des paramètres via une interface utilisateur. Dans la suite de cette section, on détaillera chaque étape indépendamment.

**Présentation générale** La figure 3.32 illustre les 5 étapes suivantes :

L'étape 1 permet la **mise en forme des données** et constitue une étape préliminaire à la reconstruction des images. Elle permet de transformer le jeu de données .ome.tiff de plans désorganisés en une matrice 5D (xyzct) dont les dimensions sont directement accessibles numériquement.

L'étape 2 consiste à **déterminer la période** de chaque ligne dans le temps (kymogramme) de l'image. Cette étape est essentielle en vue d'ajuster les disparités de périodes entre les différentes lignes y de l'image.

L'étape 3 permet le **repliement et débruitage des cycles**; sa visée est double. En repliant le signal de plusieurs cycles sur une seule période, elle permet d'une part d'ajuster la période de chaque ligne, mais aussi de condenser le signal de plusieurs cycles en un seul de meilleure qualité (plus robuste, meilleur RSB).

Les étapes 4 et 5 sont la **synchronisation des lignes**, respectivement par la **référence**, puis par la **maximisation de correspondance des images** pour l'estimation des déphasages entre lignes. La première est une estimation exacte mais peu précise de la phase : elle garantit un résultat sans propagation d'erreur, mais des déphasages à hautes-fréquences subsistent. La seconde technique sert à affiner l'estimation de ces déphasages par maximisation de correspondance des lignes adjacentes sur les zones à haute dynamique. Elle permet alors d'améliorer la précision de la reconstruction.

Si le jeu de données à reconstruire est un volume 3D, une étape supplémentaire correspondant à la **reconstruction des plans 2D vers un volume 3D** peut être ajoutée en aval de la chaîne de traitement. Cette étape 6 utilise ici uniquement le principe de maximisation de correspondance entre les plans, sans référence. Dans ce cas précis de la reconstruction de plans en volumes, la propagation des erreurs est moins prononcée et permet l'utilisation de cette technique.

A l'issue de cette chaîne de traitement, on obtient alors une image (xyt) ou un volume (xyzt) reconstruit, dont les lignes sont en phase entre elles.

### 3.2.4.1 Étape 1 : Mise en forme des données

À la sortie du microscope, le jeu de données XTYZ est enregistré au format classique de bio-imagerie .ome.tiff, via le logiciel Imspector. Ce format de données contient toute l'information du jeu de données et de ses différentes dimensions, mais aussi toutes les métadonnées associées à l'acquisition. La première étape de la chaîne de travail consiste à préparer les données brutes à être traitées par l'algorithme : c'est la mise en forme des données. Le format .ome.tiff peut être lu par MATLAB au moyen de fonctions dédiées : lorsqu'importé, le jeu de données se présente comme une liste de plans (xy) annotés suivant le plan Z, le canal, et le point temporel auxquels ils appartiennent. Pour faciliter la suite du traitement, un réarrangement dimensionnel des plans de l'image sous la forme d'une matrice en 5 dimensions (xyzct) est nécessaire. À partir de celle-ci, il est possible d'accéder à toutes les représentations utiles du signal permettant la synchronisation de l'image.

### 3.2.4.2 Étape 2 : Estimation de la période

Dans le mode d'acquisition XTY, le laser balaie une ligne un grand nombre de fois avant de passer à la suivante. Dans le cas idéal d'un cœur parfaitement périodique spatialement et temporellement, et dans des conditions d'imagerie idéales, les périodes des signaux provenant

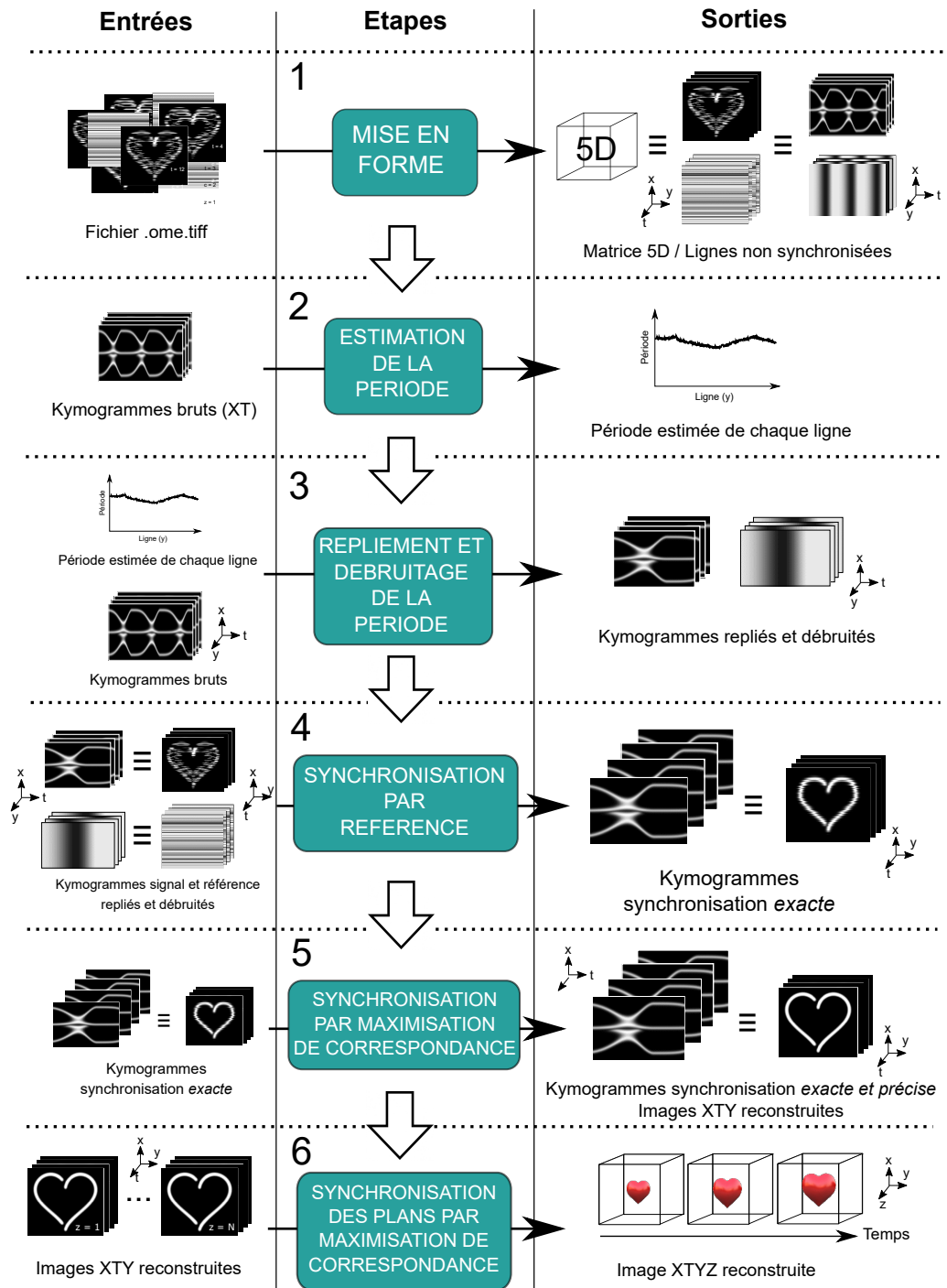


FIGURE 3.32: Diagramme de fonctionnement de l'algorithme de reconstruction d'une image XTYZ

de chaque ligne devraient être strictement identiques. Cependant en pratique, des écarts de période peuvent apparaître lors de l’acquisition. On peut identifier plusieurs raisons : les variations de température, le développement de l’embryon aux échelles de temps de l’acquisition ou encore la non-périodicité intrinsèque du cœur dans le temps ou l’espace. Dans la littérature et dans des conditions non-invasives ni phototoxiques, on peut s’attendre à une variabilité de l’ordre de 1% [31].

Les différences de périodes d’une ligne à l’autre est l’un des problèmes majeurs à la synchronisation des lignes dans le temps. En effet, si deux cycles présentent des périodes de longueurs différentes, il sera impossible de les aligner temporellement en tout point de la phase. Ainsi, pour maximiser la correspondance entre les lignes balayées, cette variabilité doit être compensée. En étirant ou en contractant linéairement les périodes, nous corrigeons leur irrégularité. Le but de cette étape est d’estimer très précisément et pour chaque ligne, la durée d’un cycle, en vue de faciliter l’étape de synchronisation et d’en améliorer les résultats.

**Méthodes d’estimation classiques** L’estimation des périodes à partir d’un kymogramme (xt) doit alors se faire au moyen une méthode rapide, mais surtout précise. En effet, la variabilité de la durée d’un battement est de l’ordre de 1% [31] : il est alors impératif d’être sensible à des variations proches du point temporel. Deux principales méthodes sont usuellement utilisées pour l’estimation de la période d’un signal périodique :

- La **transformée de Fourier**, qui donne accès à la composition spectrale du signal, et permet d’en révéler les fréquences prépondérantes.
- L’**autocorrélation**, c’est-à-dire la corrélation croisée du signal avec lui-même, qui permet de déterminer le décalage temporel pour lequel le signal se répète.

**Transformée de Fourier** La transformée de Fourier permet de représenter une fonction par la densité spectrale dont elle provient. On peut alors, grâce à cette technique, déterminer la fréquence prépondérante du signal qui correspond à la période que nous souhaitons estimer. Calculons, pour un cœur battant à  $f_{\text{cœur}} = 4\text{ Hz}$ , imagé à 1000 Hz avec 1500 passages par ligne, la résolution que nous donnerait la transformée de Fourier. Pour une transformée de Fourier discrète, la résolution  $\delta f$  est définie en nombre de la fréquence d’échantillonnage  $f_e = f_{\text{balayage}}$  et du nombre d’échantillon  $N = N_{\text{balayage}}$  :

$$\delta f = \frac{f_e}{N} = \frac{f_{\text{balayage}}}{N_{\text{balayage}}} = \frac{1000}{1500} = 0,66 \text{ Hz} \quad (3.13)$$

Ainsi, dans l’espace temporel, la période est composé de  $N_t = \frac{f_{\text{balayage}}}{f_{\text{cœur}}} = 250$  points temporels (pixels sur le kymogramme), ce qui correspond à une fréquence de 4 Hz. Selon 3.13, la transformée de Fourier pourra retourner une fréquence précise à 0.66 Hz près, soit  $f_{\text{cœur}}^{\text{TF}} \in [3.44; 4.66]$  Hz. Cela signifie que la méthode donnera l’estimation du nombre de points temporels suivante :

$$N_t^{\text{TF}} = \frac{f_{\text{balayage}}}{f_{\text{cœur}}^{\text{TF}}} \in [215; 291] \text{ px} \quad (3.14)$$

La transformée de Fourier n’est donc pas adaptée à notre problème, car trop peu précise dans nos conditions. Pour une estimation mieux résolue, il nous faudrait d’avantage de cycles. Ici, une tolérance acceptable serait de l’ordre de 1%, soit une précision à 2 points temporels/pixels et correspondant à une résolution de  $\delta f \approx 0.03 \text{ Hz}$ . Dans ces mêmes conditions d’imagerie et par le calcul de 3.13, il nous faudrait  $N_{\text{balayage}} = 33000$ , soit 33 cycles cardiaques.

**Autocorrélation** L'autocorrélation se calcule dans l'espace temporel. Dans notre cas où le signal périodique comporte un faible nombre de périodes très bien échantillonnées, la technique se révèle pertinente car précise au point temporel près. Le principe est le suivant : l'autocorrélation balaie le signal sur lui-même, et calcule leur similitude pour un décalage temporel  $\Delta t$  donné. Lorsque  $\Delta t = T$  la période du signal, la corrélation est maximale : il suffit alors de repérer le maximum de la courbe d'autocorrélation pour en déduire la période  $T$ .

Cependant, cette méthode peut-être assez coûteuse en calcul, puisqu'elle requiert un appel à une corrélation 2D pour chaque décalage temporel afin d'en trouver le maximum. La mesure étant discrète (une estimation par point temporel de décalage), il est nécessaire de calculer la corrélation pour tous les points temporels de l'image. Dans l'exemple décrit précédemment, le kymogramme comporte autant de points temporels que de passages sur une ligne, soit  $N_{\text{balayage}} = 1500$ .

Par ailleurs, la nature discrète du signal d'autocorrélation limite la précision d'estimation de la période, que nous souhaiterions sous point temporel.

**Minimisation de la dispersion de phase** La technique que nous avons finalement utilisée est inspirée du domaine de l'astronomie et permet l'estimation de la période par principe **minimisation de la dispersion de la phase** [60; 61]. Cette méthode est particulièrement indiquée dans le cas de signaux échantillonnés de manière non-uniforme, où les méthodes classiques sont inefficaces. Cependant, elle s'applique également aux autres types de signaux et présente l'avantage de pouvoir en estimer la période avec une résolution sous point temporel. Dans la suite, nous décrirons en réalité une technique dérivée de la minimisation de dispersion de phase : **l'estimation par minimisation de la corde** [62]. Cette méthode a déjà fait ses preuves, une fois encore au travers des travaux de Liebling et al. [41]. Par ailleurs et comme nous le verrons à la section 3.2.4.3, la méthode est conceptuellement très proche de l'étape 3, ce qui justifie d'avantage son utilisation.

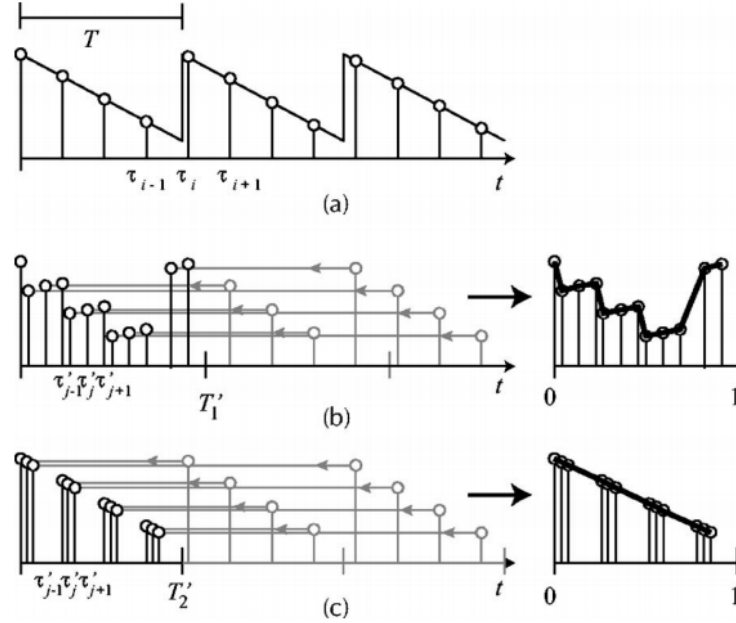


FIGURE 3.33: Principe de fonctionnement de la minimisation de la longueur de corde. (a) correspond à l'intensité du signal cyclique au cours du temps, de période  $T$ . (b) Pour une période candidate  $T'_1$ , le signal est replié sur le premier cycle, puis on calcule la longueur de la corde passant tous les points assemblés. (c) est le cas où la période candidate correspond à la véritable période  $T$ , soit  $T'_1 = T$ , ce qui se produit lorsque la longueur de la corde est minimale. Adapté de [41]

**Principe** Le principe de la méthode est présenté figure 3.33. Elle consiste à choisir un candidat  $T'$  à la période, puis de découper le signal entre autant de cycles de période  $T'$  que le signal peut contenir (a). On replie alors l'intégralité du signal sur le premier cycle, par phase croissante. La période candidate  $T'$  n'étant a priori pas entière, les différents cycles vont s'intercaler entre les points temporels du premier cycle de manière inhomogène. On calcule ensuite la longueur de corde reliant les intensités du cycle replié, c'est-à-dire la somme des distances entre chaque point et le suivant (b). Dans le cas où  $T' = T$ , la longueur de corde est minimale (c).

**Implémentation** Ainsi, pour chaque ligne  $y$  de l'image, nous travaillons sur le kymogramme  $(xt)$  en deux dimensions. Celui-ci contient généralement de 2 à 6 périodes dans la dimension  $T$  (ce qui correspond à environ 1000 points temporels) ainsi que quelques 300 pixels dans la direction  $X$ . Nous considérerons que toutes les lignes dans la dimension  $T$  partagent une période commune à tout le kymogramme. L'implémentation de l'estimation de la période se fait comme suit :

1. Création d'une fonction continue  $f(T', K_y) = l$ , qui retourne la valeur de la longueur de la corde  $l$  pour une période candidate  $T'$ , sur un kymogramme  $(xt)$  associé à une ligne  $y$   $K_y$ . La fonction :
  - (a) Assigne dans un vecteur, pour chaque pixel de position temporelle  $t_i$ , sa nouvelle position temporelle  $t'_i$  après repliement sur le premier cycle.  $t_i \equiv t'_i \pmod{T'}$ .
  - (b) Classe la dimension  $T$  du kymogramme par positions temporelles  $t'_i$  croissantes. Le kymogramme résultant n'est plus échantillonné uniformément, car les  $t'_i$  ne le sont pas.
  - (c) Pour chaque ligne dans la direction  $X$  du kymogramme  $(xt)$ , calcule la longueur de corde  $l_x$  à une dimension à l'aide du vecteur.
  - (d) Moyenne les longueurs de corde  $l_x$  en  $X$ .  $l = \langle l_x \rangle_X$ .

- (e) Retourne la longueur de corde  $l$ .
- 2. Utilisation d'une fonction de minimisation `fminbnd` tel que  $\underset{T'}{\text{minimize}} f(T', K_y)$ . La fonction retourne en quelques appels de  $f$ , le  $T'$  tel que la longueur de corde est minimale pour le kymogramme d'une ligne  $y$  donné.
  - (a) Ajuster grossièrement les bornes de `fminbnd` dans une plage raisonnable afin d'éviter d'estimer les multiples de périodes.
  - (b) La fonction retourne l'estimation  $T_y = T'$  tel que  $l$  est minimal, en quelques appels de  $f$  (converge en 5 à 10 itérations). La valeur de  $T_y$  peut être décimale.
- 3. Estimer  $T_y$  pour chaque ligne  $y$  et son kymogramme associé  $K_y$ .
- 4. Calculer l'arrondi à l'entier le plus proche de la période médiane des  $T_y$ , tel que  $T_{\text{image}} = \lceil \widetilde{T}_y \rceil$ , qui sera la période de notre image à reconstruire.

À l'issue de cette étape, nous connaissons la période estimée  $l_y$  de chaque ligne telle que le signal s'intercale le mieux au sein du premier cycle. Cela se justifie d'autant plus que c'est précisément ce que l'étape suivante tente de réaliser : replier les différents cycles en un signal de meilleure qualité et d'exactly une période. La période  $T_{\text{image}}$  devient à présent la période de l'image globale, sur lesquelles toutes les lignes devront être ajustées. On remarque également que l'utilisation d'une fonction de minimisation pour la fonction  $f(T', K_y) = l_y$  retournant la valeur de corde, permet une estimation sous point temporel (moyennant une variabilité du signal, discutée plus tard) en un minimum d'appel à la fonction. La technique permet alors une estimation rapide de la période : bien que la reconstruction se fasse a posteriori et ne soit pas contrainte par le temps, elle permet de considérablement réduire la durée de cette étape.

**Choix du signal pour estimer la période** Pour effectuer cette estimation, nous disposons deux types de signaux : le signal utile d'imagerie et le signal de référence. Empiriquement, il est rapidement apparu que le signal d'imagerie permettait une estimation plus fine de la période que celui de référence.

La figure 3.34 illustre le phénomène, pour deux reconstructions conduites sur un même jeu de données ; l'un en estimant la période par le canal de référence, l'autre en l'estimant par le canal de fluorescence. Pour la plupart des lignes, le kymogramme associé se trouve flouté, problème caractéristique d'une mauvaise estimation de la période résultant en un repliement de mauvaise qualité. Plusieurs explications permettent de comprendre pourquoi le signal de fluorescence est le signal le plus pertinent à l'estimation de la période de chaque ligne. D'abord, et comme il sera détaillé dans la section des résultats 3.3.2, la référence ne permet une estimation *précise* ni de la phase ni de la période. Lorsque l'estimation se fait sur ce signal, le résultat se trouve empiriquement, souvent loin de la véritable période : la méthode se révèle peu précise. Cela est dû à deux problèmes : d'abord, le signal de référence est un signal variant uniquement dans la direction temporelle, c'est-à-dire qu'il ne présente que peu d'informations caractéristiques suivant la direction  $x$ . Il est alors probable de mésestimer la période de quelques points temporels. Par ailleurs, le signal de fluorescence comporte beaucoup d'informations spatiales, et en particulier de haute-fréquences. Grâce à elles, l'estimation de la période peut être plus exacte, les hautes-fréquences agissant comme des points d'ancrage nécessaires une estimation exacte.

### 3.2.4.3 Étape 3 : Repliement et débruitage du cycle

Cette troisième étape exécute trois tâches cruciales à la reconstruction de l'image :

- Le repliement du signal sur exactement un cycle du battement.
- La compensation des disparités de périodes d'une ligne à l'autre.

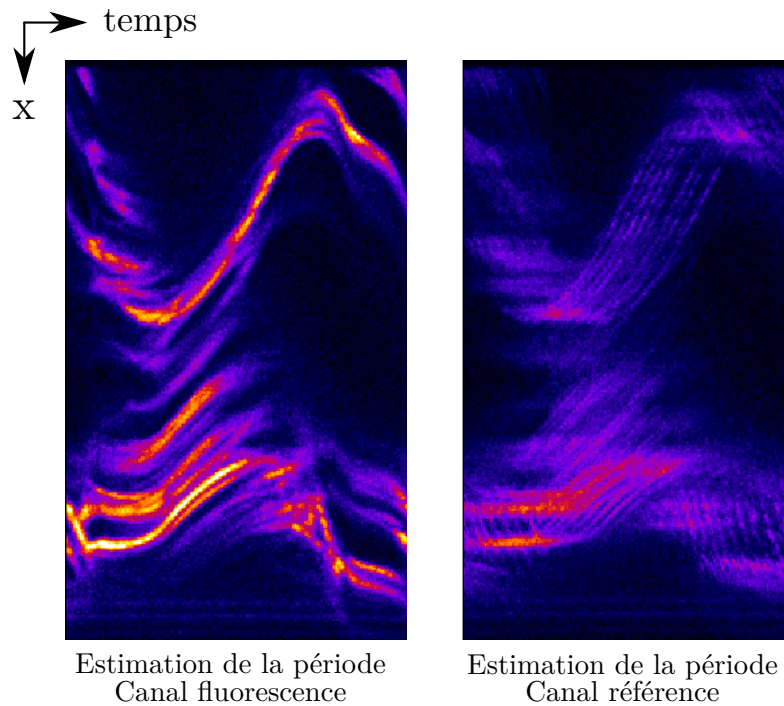


FIGURE 3.34: Comparaison typique d'un kymogramme dont la période a été estimée le canal de référence et le canal de fluorescence. L'estimation de la période par la référence renvoie parfois des résultats très peu précis. Le kymogramme débruité est alors flouté par les nombreuses périodes mal repliées.

— Le débruitage du signal, qui permet d'en augmenter le RSB global de l'image.

À ce niveau de la chaîne de traitement, nous disposons d'un vecteur  $v_T$  contenant toutes les périodes  $T_y$  associées à chaque ligne  $y$ , tel que  $v_T = [T_1 \ T_2 \ \dots \ T_i \ \dots \ T_{n_Y}]$ , ainsi que l'image  $(xyzt)$  non-synchronisée.

À partir des périodes collectées par minimisation de la corde, cette troisième étape permet au premier chef de compenser leurs disparités par contraction ou étirement linéaire du cycle, permettant ainsi leur synchronisation. Pour ce faire, il est cependant nécessaire en amont de replier tout le signal sur un unique cycle. Cette étape conduit à une amélioration du RSB de l'image, puisque l'on condense le signal collecté sur plusieurs périodes en un seul cycle de meilleure qualité.

Le repliement se fait par une méthode très similaire à celle de l'estimation de la période : le signal est découpé en cycles de périodes  $T_{image}$ , avant d'être replié par phase croissante sur le premier cycle. Les points temporels des cycles ultérieurs s'intercalent entre ceux du premier cycle. En résulte l'image du centre de la figure 3.35 : un kymogramme comprenant toujours  $N_{balayage}$  points temporels non-uniformément répartis, réagencés les uns par rapport aux autres par phase croissante.

À la fin de cette étape, il faut que la période de chaque ligne comporte exactement  $T_y = T_{image}$  points temporels, afin de garantir que la période soit uniforme sur toute les lignes de l'image. Ainsi, on procède à un rééchantillonnage de ce kymogramme replié  $(xt)$ , pour qu'il soit d'exactly  $T_{image}$  points temporels dans la direction T. Par sous-échantillonnage, on calcule les valeurs du kymogramme résultant par interpolation de type *spline*. Ce rééchantillonnage uniforme agit alors comme un moyennage local et permet de lisser le kymogramme ainsi que d'en améliorer le RSB.



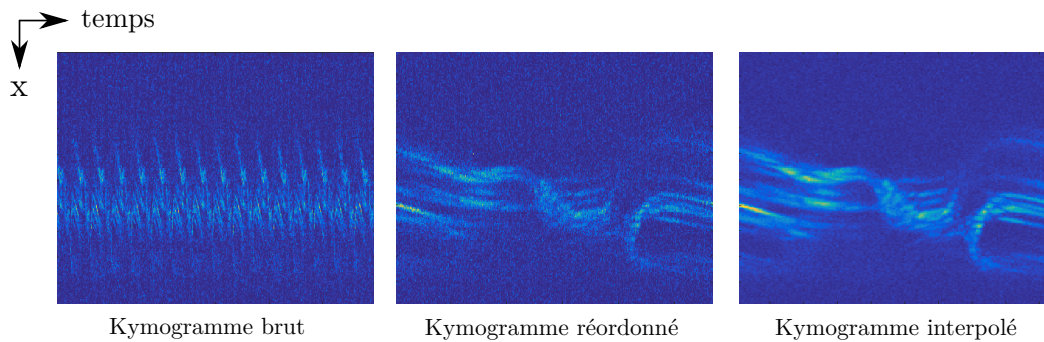


FIGURE 3.35: Repliement de plusieurs cycles via le kymogramme d’une ligne. L’opération s’effectue en deux étapes : d’abord, on réordonne les points temporels grâce à l’information de la période  $T$ . Puis, sur le kymogramme réordonné, on interpole les pixels pour obtenir le nombre de points temporels  $T = T_{\text{image}}$

**Choix des meilleures périodes** Après les premières acquisitions, il est rapidement apparu qu’il pouvait y avoir des différences importantes dans la qualité des cycles, au sein d’un même kymogramme. Régulièrement, on constate des arythmies du battement ou encore des signaux non-périodiques indésirables sur l’image  $(xt)$ . Pour éviter que ces cycles aberrants n’altèrent le résultat du kymogramme replié et dégradent la reconstruction entière de l’image, il était important de se prémunir de ce problème et trouver un moyen de rejeter les cycles de mauvaise qualité.

Pour ce faire, l’utilisateur peut décider de n’exploiter qu’une partie du signal et d’indiquer le nombre de cycles sur lequel faire le repliement pour chaque kymogramme. Dans l’exemple où l’on a collecté 6 périodes par ligne  $y$ , on peut par exemple choisir de n’en sélectionner que 4, qui permettront une meilleure reconstruction. Dans la pratique, l’algorithme choisit aléatoirement 4 cycles parmi les 6 et les replie. La longueur de corde fait office de métrique et témoigne de la qualité du repliement. La meilleure combinaison de 4 cycles au sens de la longueur de corde est alors utilisée pour le rééchantillonnage.

**Implémentation** Continuons avec l’exemple d’une image dynamique  $(xyt)$ , de dimension  $300 \times 200 \times 1000$ . La méthode utilise toujours les kymogrammes  $(xt)$  associés à chaque ligne  $y$ , de dimension  $300 \times 1000$ . On considérera que la période de  $K_y$  est de  $T'_y = 202$  points temporels, ce qui signifie que le kymogramme contient un peu moins de 5 cycles. La période globale de l’image a été estimée à  $T_{\text{image}} = 199$  points temporels.

1. Choisir les cycles qui se replient le mieux entre eux, au sens de la longueur de la corde. Cette étape permet d’écarter d’éventuelles périodes aberrantes (arythmies, période différente etc.).
  - (a) Découper le signal en autant de cycles  $N_{\text{cycles}}$  que le kymogramme  $K_y$  en contient.
  - (b) Calculer, pour une combinaison de quelques cycles (définis par l’utilisateur, par exemple  $N_{\text{selec}} = 3$  cycles sur  $N_{\text{cycles}} = 5$  disponibles) aléatoirement choisis, la longueur de corde du repliement.
  - (c) Sélectionner la meilleure combinaison pour le repliement.
2. Replier le kymogramme  $K_y$  de période connue  $T'_y$  de telle sorte à ce qu’il ne présente qu’un exact cycle de période  $T'_y$ , et de meilleur RSB. On ne utilise donc que les meilleurs cycles  $N_{\text{selec}}$  déterminés à l’étape précédentes :
  - (a) Assigne dans un vecteur, pour chaque pixel de position temporelle  $t_i$ , sa nouvelle position temporelle  $t'_i$  après repliement sur le premier cycle.  $t_i \equiv t'_i \pmod{T'_y}$ .

- (b) Classe la dimension T du kymogramme par positions temporelles  $t'_i$  croissantes. Le kymogramme résultant n'est plus échantillonné uniformément, car les  $t'_i$  ne le sont pas. Le kymogramme est toujours de dimension 300x1000, les lignes temporelles sont seulement réarrangées.
- 3. Rééchantillonner le kymogramme pour que sa période soit égale à celle de l'image globale, par interpolation de type *spline*. Le kymogramme résultant est alors de dimension 300x199, et comprend un unique cycle de longueur exactement  $T_{\text{image}}$ .
- 4. Répéter pour chaque kymogramme  $K_y$  associé à chaque ligne.
- 5. Associer les kymogrammes (xy) pour reconstruire une image (xyt) non synchronisée, mais présentant un unique cycle de période  $T_{\text{image}}$

#### 3.2.4.4 Étape 4 : Estimation de la phase par référence

Les kymogrammes sont à présent repliés sur un cycle exactement, de meilleur RSB. Cependant, ils sont toujours désynchronisés les uns des autres d'un déphasage  $\Delta\phi_{y-y+1}$ . Il s'agit désormais de déterminer pour chaque kymogramme  $K_y$  associé à une ligne y, son déphasage  $\phi_y$  tel quel toutes les lignes sont synchronisées en phase. Comme décrit plus tôt, nous utiliserons le canal de référence afin d'estimer le déphasage de manière exacte.

À l'instar de la technique de minimisation utilisée pour l'estimation des périodes, nous allons ici aussi déterminer les déphasages par minimisation d'une fonction continue. Cette fonction  $f_{K_{\text{ref}}}(\phi, K_y)$  calcule, pour un déphasage donné  $\phi$ , la distance  $d$  d'un kymogramme en argument associé à la ligne y  $K_y$ , à un kymogramme de référence  $K_{\text{ref}}$  associé à une ligne  $y_{\text{ref}}$ . Le choix du kymogramme  $K_{\text{ref}}$  importe peu, puisque la forme de la modulation ne change pas en y. On choisira en général arbitrairement la ligne y telle que  $y = \frac{n_Y}{2}$ .

La fonction ainsi définie peut être utilisée pour déterminer le déphasage  $\phi$  qui minimise la similitude entre le kymogramme déphasé et le kymogramme de référence. Elle permet, comme pour l'estimation de la période, d'obtenir une estimation sous point temporel du déphasage, en seulement quelques appels à la fonction. En répétant l'opération pour chaque kymogramme  $K_y$ , on peut alors synchroniser toutes les lignes avec le kymogramme de référence  $K_{\text{ref}}$ , ce qui équivaut à resynchroniser tous les kymogrammes entre eux.

À ce niveau de la chaîne de traitement, les lignes sont synchronisées : l'image (xyt) est alors reconstruite, au moins partiellement. L'image ainsi reconstruite révèle alors le battement cardiaque au cours du temps.

**Choix du signal pour estimer la phase** Pour cette étape, nous utilisons naturellement le signal de référence provenant de la modulation cardiaque, pour laquelle nous avons développé le module placé sous le microscope. Il comporte deux avantages : d'abord il est modulé directement par le battement cardiaque et nous permet d'extraire de manière synchrone au signal d'imagerie, la phase de la contraction à chaque instant. Ensuite, ce signal de référence reste identique tout au long de l'acquisition et ne dépend ni de la ligne y, ni du plan z imagé. Ainsi, en estimant les déphasages sur ce signal, on s'assure d'avoir accès à une valeur de  $\Delta\phi_{\text{ref}}$  exacte, c'est-à-dire centrée sur le véritable déphasage entre deux kymogrammes.

C'est la limitation principale du signal utile d'imagerie (fluorescence, SHG/THG), pour l'estimation du déphasage. D'un kymogramme à l'autre, deux paramètres sont modifiés : d'une part, le déphasage  $\phi$  inhérent à l'acquisition XTYZ, d'autre part, l'information spatiale contenue est différente puisqu'elle correspond à une autre ligne y. Cela revient alors à synchroniser deux images déphasées, mais aussi légèrement différentes spatialement. Il est impossible de déterminer a posteriori la part de chacune de ces contributions à la différence des images :

en résulte l'apparition d'artefacts de reconstruction. La corrélation vise à estimer le déphasage tel qu'il maximise la correspondance des kymogrammes entre eux : dans le cas d'une déformation spatiale, cela ne correspond pas toujours exactement au cas où  $\Delta\phi_{\text{est}} = \Delta\phi_{\text{réel}}$ .

### Implémentation

1. Choisir une ligne de référence et son kymogramme  $K_{\text{ref}}$  provenant du **canal de référence**. Généralement au milieu de l'image à  $y = \frac{ny}{2}$
2. Création d'une fonction continue  $f_{K_{\text{ref}}}(\phi, K_y) = d$  qui retourne la distance  $d$  du kymogramme de référence  $K_{\text{ref}}$  au kymogramme  $K_y$ , déphasé circulairement de  $\phi$  (nombre décimal compris entre 0 et  $T_{\text{image}} - 1$ , ) :
  - (a) Assigne dans un vecteur, pour chaque pixel de position temporelle  $t_i$ , sa nouvelle position temporelle  $t'_i$  après application du déphasage  $\phi$ . On a alors :  $t_i + \phi \equiv t'_i \pmod{T_{\text{image}}}$ . Le kymogramme étant cyclique, les valeurs de  $t'_i$  sont comprises entre 0 et  $T_{\text{image}} - 1$
  - (b) Déphaser le kymogramme (xt)  $K_y$  dans la direction temporelle T d'un déphasage **non-entier**  $\phi$  points temporels. Pour ce faire, il est nécessaire d'interpoler les valeurs des pixels du kymogramme déphasé  $k_y^\phi$ , à l'aide des  $t'_i$  non-entiers les plus proches.
  - (c) Calculer la distance  $d$  au sens du carré de la différence, pixel à pixel, pour les deux kymogrammes superposés, tel que  $d = \sum_{x=0}^{n_x-1} \sum_{t=0}^{T_{\text{image}}-1} (K_y^\phi(x, t) - K_{\text{ref}}(x, t))^2$
  - (d) Retour la distance  $d$
3. Utilisation d'une fonction de minimisation `fminbnd` tel que  $\underset{\phi}{\text{minimize}} f_{K_{\text{ref}}}(\phi, K_y)$ . La fonction retourne en quelques appels de  $f$ , le  $\phi_y$  tel que la distance entre  $K_y$  et  $K_{\text{ref}}$  est minimale, c'est-à-dire lorsque leur correspondance est maximale.
4. Estimer le déphasage  $\phi_y$  de chaque  $K_y$  (associé à une ligne  $y$ ) par rapport au kymogramme de référence  $K_{\text{ref}}$ .
5. Déphaser chaque kymogramme  $K_y$  de  $\phi_y$ , par la même méthode qu'au 2.(a) et (b) afin de synchroniser les kymogrammes entre eux.

#### 3.2.4.5 Étape 5 : Estimation de la phase par maximisation de correspondance

La reconstruction de l'image (xyt) est alors visuellement convaincante sur la plupart du cycle. Cependant, sur certaines régions rapides, on observe de légères cassures et retards d'une ligne sur l'autre. Ces artefacts correspondent en réalité à des déphasages de hautes fréquences : la synchronisation par la référence a beau être exacte, elle n'est pas précise. En effet, elle permet d'assurer qu'il n'y a pas de propagation d'erreurs sur l'étendue de l'image : les lignes sont synchronisées autour de la phase réelle, mais avec une précision de quelques points temporels (section 3.3.2). Pour corriger ces défaut, il faut affiner la synchronisation afin de la rendre plus précise.

Ainsi, on applique cette correction sous la forme d'une seconde synchronisation des lignes, par maximisant de leur correspondance, sur le signal d'imagerie cette fois. Ainsi, on permet d'affiner la synchronisation et compenser les erreurs de reconstructions. Il est cependant important de rappeler que cette technique de maximisation de la correspondance sur le signal d'imagerie, est une technique précise, mais peu exacte : elle propage les erreurs. On utilisera alors l'information de la phase estimée par la méthode de référence, comme garde-fou à la mesure.

La comparaison se fait alors une fois encore en définissant une fonction continue. Cette fois, c'est entre un kymogramme  $K_y$  associé à la ligne  $y$ , et le kymogramme adjacent  $K_{y'}$ , à la

ligne  $y' = y + 1$ . La distance estimée est alors la somme des carrés de la différence des signaux utiles d'imagerie. On obtient alors dans la dimension Y, les déphasages relatifs ligne à ligne  $\Delta\phi_{y,y+1}$ . À partir de ceux-ci, on peut calculer pour chaque ligne, les déphasages absolus  $\phi_y$  par rapport à une phase arbitraire commune.

**Dérive de la phase par maximisation de correspondance** Lors d'une estimation du déphasage  $\phi_y$  par maximisation de la correspondance sur le signal d'imagerie, les erreurs se propagent de proche en proche. Cependant, il est possible de distinguer ces erreurs, variant lentement en fonction de  $y$ , des déphasages locaux d'une ligne sur l'autre : le premier, à écarter, est une contribution basse fréquence, quand le déphasage local à corriger est contenu dans les hautes fréquences. Ainsi, en considérant le signal  $\phi(y)$  comme une fonction de  $y$ , on peut rejeter la contribution provenant de l'accumulation des erreurs en lui appliquant un **filtre passe-haut**.

En effet, on sait la synchronisation par référence *exacte* : cela signifie que la phase de chaque ligne est proche de sa vraie phase de synchronisation, sans biais. Ainsi, le déphasage obtenu par maximisation de la correspondance doit lui aussi être de moyenne nulle en fonction de  $y$ , au moins sur une fenêtre glissante. Par ailleurs, les lignes sont à ce stade de la reconstruction, déphasées de quelques points temporels au maximum. Le signal  $\phi(y)$  ne doit pas dépasser les quelques points temporels en amplitude. Avec ces deux critères, on construit le filtre à appliquer de telle sorte à ne conserver que des contributions hautes fréquences du signal raisonnable, et centrées sur zéro. Il suffit alors d'appliquer les déphasages sur chacun des kymogrammes  $K_y$  pour reconstruire l'image (xyt).

À ce niveau du traitement, nous avons reconstruit un plan dynamique (xyt), par synchronisation des lignes de manière *exacte* et *précise*. Cette assertion sera démontrée et discutée à la partie 3.3.2.

**Implémentation** L'implémentation décrite ci-dessous utilise l'image préalablement synchronisée par la méthode d'estimation par référence. À partir de celle-ci, on procède comme suit :

1. Création d'une fonction continue  $f(K_y, K_{y'}, \phi) = d$  qui retourne la distance  $d$  du kymogramme  $K_y$  associé à la ligne  $y$ , déphasé circulairement de  $\phi$ , au kymogramme adjacent  $K_{y'}$  associé à la ligne  $y' = y + 1$ .  $\phi$  est nombre décimal compris entre 0 et  $T_{\text{image}} - 1$  :
  - (a) Assigne dans un vecteur, pour chaque pixel de position temporelle  $t_i$ , sa nouvelle position temporelle  $t'_i$  après application du déphasage  $\phi$ . On a alors :  $t_i + \phi \equiv t'_i \pmod{T_{\text{image}}}$ . Le kymogramme étant cyclique, les valeurs de  $t'_i$  sont comprises entre 0 et  $T_{\text{image}} - 1$ .
  - (b) Déphaser le kymogramme (xt)  $K_y$  dans la direction temporelle T du déphasage **non-entier**  $\phi$  points temporels. Pour ce faire, il est nécessaire d'interpoler les valeurs des pixels du kymogramme déphasé  $k_y^\phi$ , à l'aide des  $t'_i$  non-entiers les plus proches.
  - (c) Calculer la distance  $d$  au sens du carré de la différence, pixel à pixel, pour les deux kymogrammes superposés, tel que  $d = \sum_{x=0}^{n_X-1} \sum_{t=0}^{T_{\text{image}}-1} (K_{y+1}^\phi(x, t) - K_{y'}(x, t))^2$
  - (d) Retour la distance  $d$
2. Utilisation d'une fonction de minimisation `fminbnd` tel que  $\underset{\phi}{\text{minimize}} f_{K_{\text{ref}}}(\phi, K_y)$ . La fonction retourne en quelques appels de  $f$ , le  $\phi_y$  tel que la distance entre  $K_y$  et  $K_{\text{ref}}$  est minimale, c'est-à-dire lorsque leur correspondance est maximale.

3. Estimer le déphasage  $\phi_y$  de chaque  $K_y$  (associé à une ligne  $y$ ) par rapport au kymogramme de référence  $K_{y+1}$ .
4. Répéter l'opération pour chaque  $y$  compris entre 1 et  $n_Y - 1$ . On obtient alors un vecteur des déphasages  $\Delta\phi_{y,(y+1)}$  correspondant aux déphasages estimés entre le kymogramme en  $y$ , et le kymogramme en  $y+1$ .
5. Calculer le déphasage absolu  $\phi_y$  de chaque kymogramme à partir des déphasages relatifs  $\Delta\phi_{y,(y+1)}$ .
6. Filtrer le vecteur des déphasages par un filtre passe-haut, afin de retirer la propagation d'erreur basse fréquence en  $y$ , et ne conserver que les déphasages hautes fréquences.
7. Déphaser chaque kymogramme  $K_y$  de  $\phi_y$  par la même méthode qu'au 1.(a) et (b) afin de synchroniser les kymogrammes entre eux.

**Une étape semi-automatisée** Cette étape 5 n'est en réalité pas entièrement automatisée : l'utilisateur peut modifier les paramètres de synchronisation via une interface utilisateur, présentée figure 3.36. Celle-ci lui permet alors, en amont de la reconstruction de :

- Sélectionner une zone d'intérêt spatiale sur laquelle appliquer cette seconde synchronisation. On peut ainsi choisir de ne corriger qu'une partie de l'image en  $x$  et  $y$ .
- Sélectionner une zone d'intérêt temporelle sur laquelle estimer les déphasages. Réduire la fenêtre temporelle comporte deux avantages. Le premier est que cela peut permettre de se concentrer uniquement sur les régions de mouvement rapides, où la maximisation de correspondance est plus précise. Le second est que l'on raccourcit le kymogramme ( $xt$ ) dans la direction  $T$ , ce qui a pour effet de réduire le temps de traitement.
- Affiner la synchronisation itérativement, en visualisant les résultats intermédiaires. L'interface permet de répéter l'étape autant de fois que nécessaire, jusqu'à l'obtention d'un résultat convaincant.

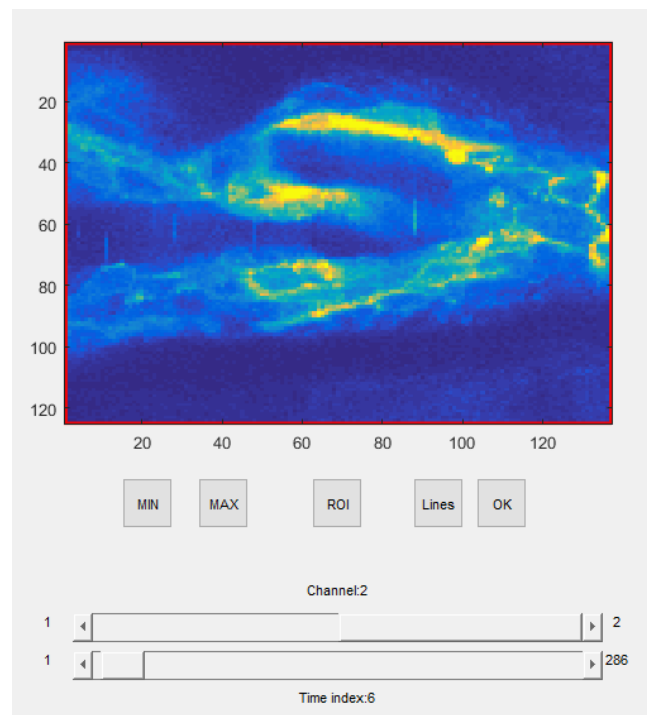


FIGURE 3.36: Interface utilisateur de la synchronisation par maximisation de correspondance. Grâce à elle, il est possible de choisir des régions d'intérêt spatiales et temporelles, ainsi que d'appliquer la correction sur une zone définie de l'image.

### 3.2.4.6 Étape 6 : Reconstruction du volume

La dernière étape concerne la reconstruction volumique des images (xyzt), à partir des plans (xyt) déjà synchronisés. Nous procédons dans cette partie de manière analogue à la technique présentée dans [41]. Il s'agit ici d'une reconstruction de type 2D vers 3D, et pas 1D vers 3D. Dans la pratique, toutes les images ne sont pas des images volumiques (xyzt). Dans le cas d'une reconstruction XTY, cette étape ne sera pas exécutée. Ici, on se ramène alors au problème de reconstruction XYTZ : la propagation d'artefact n'est plus aussi problématique et l'ajout de la référence n'est plus aussi crucial.

## 3.3 Résultats

Dans cette section, nous allons développer les résultats de l'imagerie XTYZ. Ceux-ci peuvent être scindés en deux catégories : la première contiendra les résultats de la caractérisation intrinsèque de la méthode de reconstruction, qui permettra d'en quantifier les performances. Dans un second temps, nous étudierons plus spécifiquement les résultats des applications biologiques pour lequel la méthode a été utilisée, en particulier l'étude dynamique de la contraction des sarcomères *in vivo*.

### 3.3.1 Performances d'imagerie

Nous illustrons cette section préliminaire de cette section de résultats par la figure 3.37, attestant que la méthode décrite précédemment nous permet effectivement de reconstruire des images à très haute vitesse, présentant par ailleurs une excellente résolution spatiale. Dans cette section, nous tâcherons de détailler les performances d'imagerie de la méthode afin de les mettre en perspectives avec l'état de l'art, et ainsi prouver la pertinence de notre développement. Au cours de ce projet, nous avons acquis et reconstruit plus d'une centaine de jeux de données, à partir de plusieurs lignées transgéniques ou sauvage. Dans le cas général, la reconstruction fonctionne toujours lorsque le signal de référence est de qualité correcte et permet de reconstituer de manière systématique une image visuellement convaincante. On observe que la qualité finale de la reconstruction est très liée à la modulation du signal de référence par le battement cardiaque. À nouveau, dans le cas général, nous parvenons toujours à obtenir un signal de modulation de qualité décente.

**Conditions typiques d'imagerie** De manière typique, nos images présentent les caractéristiques suivantes : fréquence d'imagerie comprise entre 600 et 1200 Hz ; taille d'environ 300x200 px pour un échantillonnage compris entre 0.3 et 0.5  $\mu\text{m}/\text{px}$  en XY, et 1 à 5  $\mu\text{m}/\text{px}$  en Z. Cela correspond à un temps passé par pixel compris entre 1 et 5  $\mu\text{s}$ . La plupart des acquisitions ont été conduites sur des poissons à 4 ou 5 dpf. Le signal SHG a été obtenu dans le cas général par excitation à  $\lambda = 1090 \text{ nm}$  pour une détection en transmission à 550 nm. Le temps d'acquisition est très variable : il est d'environ 5 à 10 minutes pour un plan 2D seul. Les acquisitions 3D peuvent durer jusqu'à une heure en fonction du nombre de plans imagés.

**Discussion** Les résolutions temporelles et spatiales que nous proposons par cette méthode sont inédites, en particulier en imagerie SHG, mais aussi comparativement aux techniques d'imagerie rapide à fluorescence en général. Pour s'en convaincre, on peut notamment comparer le taux de pixels de nos acquisitions, à leur équivalent en imagerie point par point, c'est-à-dire par un balayage séquentiel des pixels. Par exemple, considérons jeu de données présenté plus tard à la figure 3.54, dont les dimensions sont les suivantes :  $(n_X, n_Y, n_Z) = 359 \times 317 \times 9$  voxels avec une résolution de  $(\delta_X, \delta_Y, \delta_Z) = 0.41 \times 0.41 \times 2.5 \mu\text{m}/\text{px}$ , imagé à  $f = 1000 \text{ Hz}$ . Le calcul du taux de pixels équivalent s'obtient comme suivant :

$$\text{Taux Pixel} = n_X \times n_Y \times n_Z \times f = 1024 \text{ MHz} \quad (3.15)$$

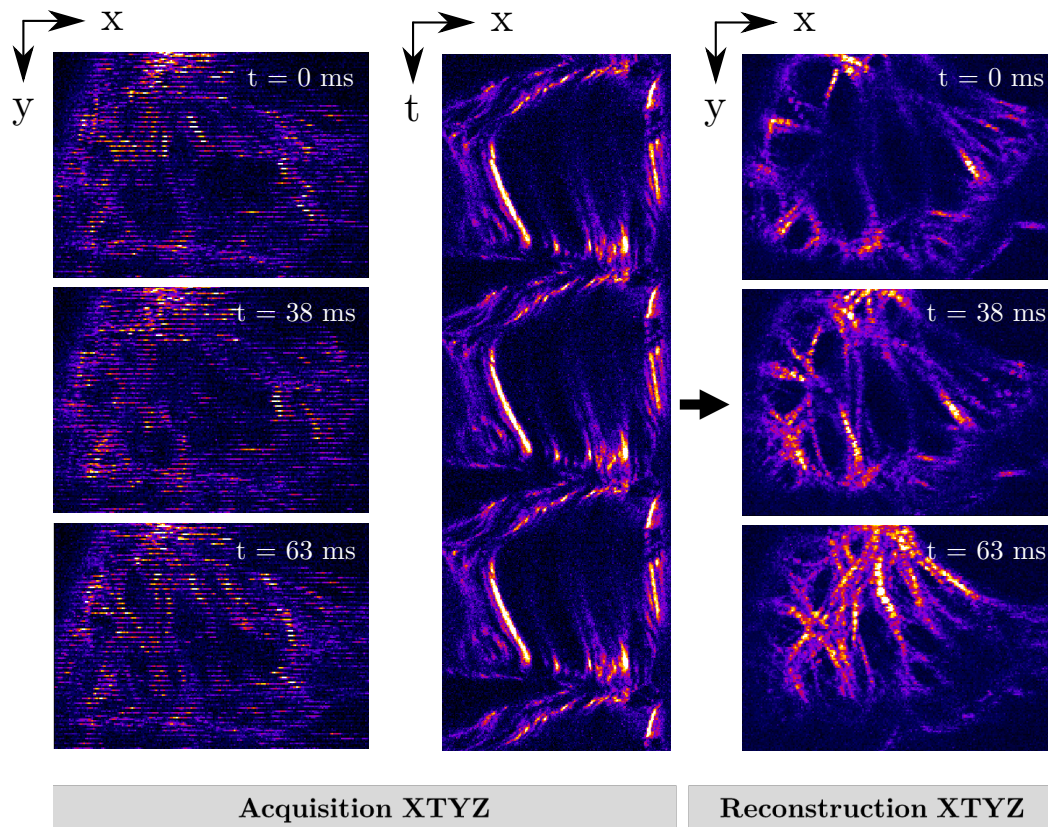


FIGURE 3.37: Exemple d'image obtenue par imagerie XTY à 800 Hz. L'image dynamique de gauche est celle que l'on obtient par acquisition XTY. En synchronisant les kymogrammes (image du milieu), on reconstruit alors une image à très haute vitesse. 800 Hz ;  $\lambda = 1090$  nm ;  $0.38 \mu\text{m}/\text{px}$  ;  $197 \times 141$  px ; période 225 ms.

Cette valeur est à interpréter comme ceci : si l'on devait acquérir tous les pixels de notre acquisition en un unique cycle cardiaque, nous aurions besoin de pouvoir collecter l'information de près d'un milliard de pixels à la seconde. À titre de comparaison, la caméra sCMOS est à ce jour la référence des détecteurs rapide en imagerie à fluorescence. Le taux de pixels maximal théorique proposé par ce détecteur est alors de 400 MHz (image de  $2000 \times 2000$  pixels à 100 images par seconde). Ainsi, dans le cas général des acquisitions haute-vitesse, la vitesse d'imagerie est limitée par le détecteur [31]. Par ailleurs, dans les configurations classiques point par point, pousser la vitesse d'acquisition nécessite également de baisser le temps passé par pixel. En prenant la valeur du taux pixel de 1024 MHz de notre acquisition d'exemple, cela signifie que l'on peut passer au maximum  $t_{\text{dwell}} = \frac{1}{1024 \times 10^6} = 0,97$  ns/px. Dans notre cas et grâce à la périodicité du coeur, nous pouvons accumuler du signal pendant un temps équivalent à  $t_{\text{dwell}} = \frac{1}{n_x \times f} = 2,8$   $\mu\text{s}/\text{px}$  et ainsi conserver une très bonne qualité d'imagerie. Dans la pratique, nous ne sommes donc pas limités par les détecteur ni par le niveau de signal. Sur le dispositif TriMScope actuel, ce sont les miroirs galvanométriques qui sont limitant, ceux-ci ne pouvant balayer les lignes plus fréquemment que 1200 Hz. Pour améliorer ceci, nous pourrions utiliser des scanners résonants et ainsi pousser la vitesse d'imagerie jusqu'à 8 kHz. Cependant, le coeur ne présente pas de mouvements nécessitant de telles vitesses ; pour démontrer l'utilité de ces fréquences d'imagerie, il faudrait alors l'appliquer à un autre système périodique hautement dynamique.

Au bilan de nos acquisitions, l'imagerie XTYZ permet une vitesse d'imagerie sans précédent qui met en défaut les limites théoriques des détecteurs actuels. Nos jeux de données

ainsi reconstruits permettent de visualiser des structures jusqu'alors impossible à résoudre, tant du point de vue temporel que spatial.

### 3.3.2 Une reconstruction XTYZ exacte et précise

L'un des problèmes récurrents à la synchronisation d'image par déclenchement rétrospectif, est de s'assurer que l'image reconstruite est une représentation fidèle de la réalité biologique. Cette question est fondamentale et les performances de l'algorithme doivent être quantifiées très rigoureusement. En particulier, et comme nous l'avons décrit précédemment dans la section introductive de ce chapitre 3.2.1.4, il est impératif que la reconstruction soit à la fois *exacte* et *précise*. Pour que notre algorithme de reconstruction puisse être caractérisé comme *exact*, il nous faudra quantifier la distance entre l'image reconstruite et la réalité biologique du battement. Pour pouvoir le caractériser comme *précis*, il sera nécessaire que différentes reconstructions d'un même jeu de données renvoient des images proches, c'est-à-dire que la dispersion des résultats soit faible. Pour ce faire, nous allons dans cette section discuter, au moyen de stratégies diverses, de l'exactitude et la précision de chaque méthode indépendamment : d'abord le recalage par maximisation de correspondance seul, ensuite celui utilisant la référence, puis l'action combinée des deux techniques. La figure 3.38 dresse le bilan illustré des méthodes indépendantes et combinée.

**Formalisme de reconstruction** L'objectif principal de la reconstruction d'image est essentiellement de synchroniser chaque ligne de l'image temporellement. En d'autres termes, il s'agit de parvenir à estimer, pour chaque ligne  $i$  et par rapport à une ligne de référence quelconque, le déphasage  $\Delta\phi_i^{est}$  tel qu'il se rapproche au plus du déphasage réel  $\Delta\phi_i$ .

On peut alors écrire la relation suivante, pour chaque ligne  $i$  :

$$\Delta\phi_i^{est} = \Delta\phi_i + k_i + \sigma_i = \Delta\phi_i + \text{error} \quad (3.16)$$

où  $k_i$  correspond au biais d'estimation (par exemple induit par la différence d'information spatiale contenue entre deux lignes), et  $\sigma_i$  correspond au bruit d'estimation. Par définition, on a alors  $\langle k_i \rangle \neq 0$  et  $\langle \sigma_i \rangle = 0$ .

Avec la méthode de **synchronisation par référence** seule, on élimine le biais systématique mais on est toujours sensible au bruit de la synchronisation temporelle. L'équation devient alors :

$$\Delta\phi_i^{est} = \Delta\phi_i + \sigma_i \quad (3.17)$$

Avec la méthode de **synchronisation par maximisation de correspondance** seule, on tente de minimiser la correspondance visuelle entre les lignes par décalage temporel. Dans la pratique, on peut réduire l'équation comme suivant :

$$\Delta\phi_i^{est} = \Delta\phi_i + k_i \quad (3.18)$$

Dans ce cas, le  $k_i$  de moyenne non-nulle compense également le bruit. En réalité,  $k_i$  est biaisé par la différence d'information contenue entre deux lignes successives. En effet, il est impossible de dissocier un décalage temporel d'une déformation spatiale sur le kymogramme. L'algorithme va donc essayer de maximiser la correspondance, peu importe si celle-ci est biologiquement pertinente ou non.

Avec la méthode de **synchronisation par référence couplée à la maximisation de correspondance** que nous avons utilisée, nous associons alors les avantages des deux techniques : d'une part, la référence permet de s'affranchir du biais d'estimation de par sa



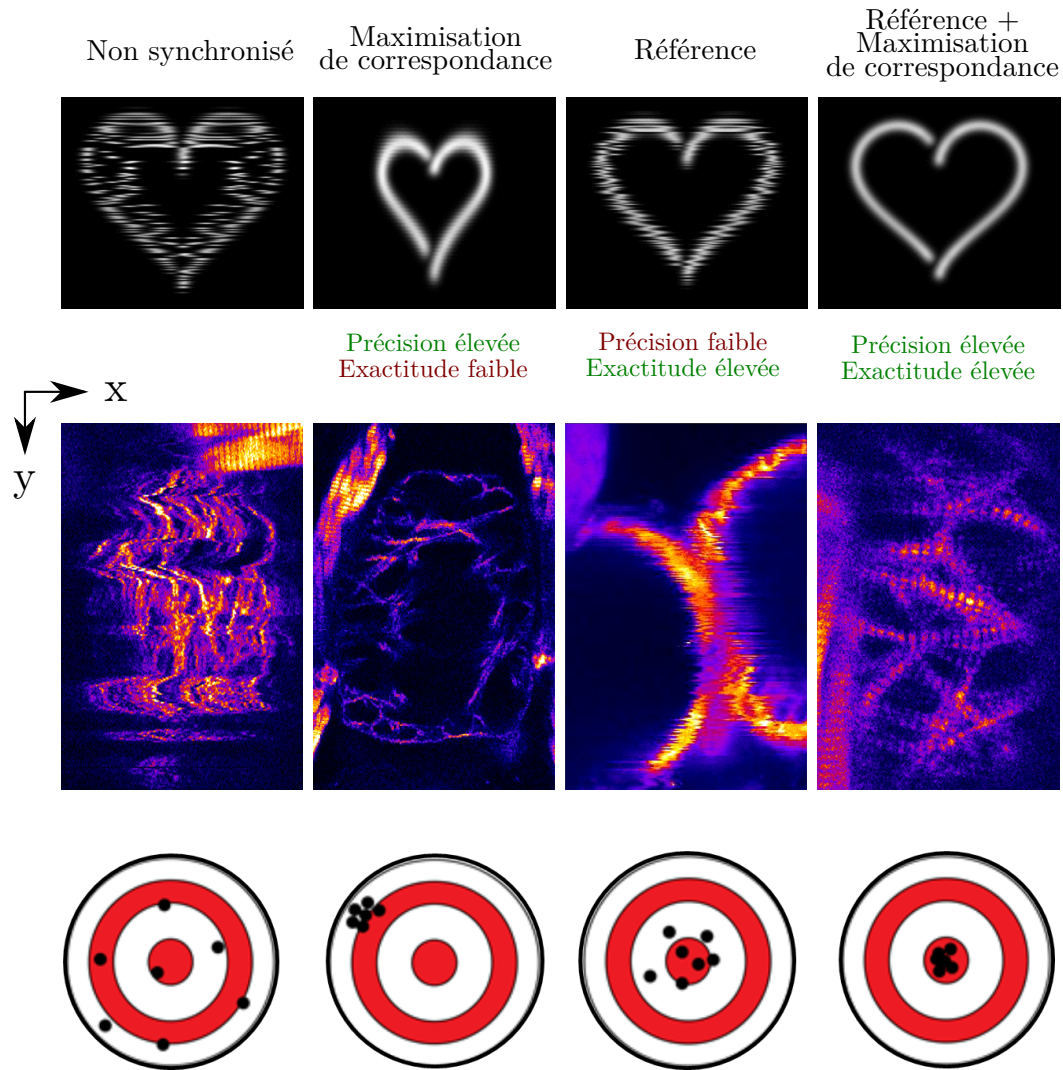


FIGURE 3.38: Schéma récapitulatif des méthodes de reconstruction caractérisées pour la précision et l'exactitude dans cette section. Sont comparées ici l'image brute, les deux méthodes de reconstruction indépendantes, et la méthode combinée. Associés à chaque cas, des exemples d'acquisitions présentant l'allure typique et les artefacts caractéristiques de la reconstruction. Pour la maximisation de correspondance, on observe des artefacts dus à la propagation d'erreur sous la forme de vagues spatiales. Pour la reconstruction par référence, on observe des stries dues au manque de précision. Enfin, la reconstruction combinée ne présente pas d'artefacts apparents.

propriété d'*exactitude*, et la corrélation d'atténuer le bruit d'estimation que la référence ne permet pas de corriger. Ainsi, on peut écrire dans ces conditions :

$$\Delta\phi_i^{est} = \Delta\phi_i \quad (3.19)$$

**Estimation de la phase par référence seule** La caractérisation de la performance de l'algorithme de reconstruction XTY est facilitée par l'existence du signal de référence externe que nous avons implémenté. Grâce à lui, nous avons une estimation indépendante et exacte de la phase du cycle cardiaque à tout instant de l'acquisition, et peu importe la ligne ou le plan imagé. Cependant, lorsque les reconstructions sont effectuées uniquement à partir du signal de référence, les images résultantes présentent de forts artefacts de reconstruction. Comme illustré à la figure 3.40, on observe au niveau des régions rapides, des stries dans la direction de reconstruction. Par cette méthode, et à l'inverse des résultats lissés obtenus par maximisation de correspondance, la reconstruction semble souffrir de légers décalages temporels aléatoires d'une ligne à l'autre.

**Exactitude** De par son implémentation, l'illumination de référence permet d'extraire un signal cyclique modulé par le battement cardiaque de l'échantillon, et synchronisé avec le signal utile. La forme de ce signal cyclique n'a pas d'importance, tant que celle-ci reste identique tout au long de l'acquisition. Ainsi, la reconstruction par référence utilise le signal modulé par le cœur pour synchroniser temporellement les lignes ; en d'autres termes, cette méthode utilise une estimation de la phase cardiaque à chaque ligne pour estimer le déphasage d'une ligne à l'autre. Par construction, l'estimation de la phase et par extension la reconstruction par référence, sont nécessairement *exactes*.

**Précision** La précision de la reconstruction par la référence seule est assez évidente à caractériser, cette fois visuellement. La figure 3.40 permet de constater le manque de précision de la méthode par référence seule. Sur l'image de gauche, on observe un cliché instantané de la reconstruction d'un cœur battant à haute dynamique. On note que, bien que la reconstruction soit satisfaisante sur la plupart de l'image, des stries apparaissent nettement aux niveaux des structures rapides. Ces artefacts correspondent à une synchronisation temporelle imparfaite, qui se révèle lors des mouvements rapides du cœur sur l'image. Avec l'image seule, le critère visuel permet d'affirmer avec certitude que la précision de reconstruction n'est pas suffisante pour tirer profit de la résolution temporelle d'acquisition : les artefacts empêchent alors distinguer spatialement les structures rapides. La précision de la reconstruction est ainsi à améliorer, par exemple en la combinant avec la méthode de maximisation de correspondance.

**Estimation de la phase par maximisation de correspondance seule** La technique de maximisation de correspondance, par maximisation de la corrélation ou minimisation de la distance, est l'approche classique de synchronisation d'acquisition XYTZ [41]. Les avantages sont multiples : elle ne nécessite pas de signal externe supplémentaire et donne de très bons résultats dans le cas de la reconstruction 2D vers 3D. Par essence, la méthode vise à trouver le décalage temporel qui maximise la correspondance entre les plans adjacents ; le rendu des reconstructions est alors visuellement très convaincant. Toutefois, dans le cas des acquisitions XTY, cette technique trouve ses limites. En particulier, la reconstruction d'images par lignes nécessitant la synchronisation de centaines de kymogrammes entre eux, le problème de la dérive de phase se révèle très limitant. Dans ce cas, il est difficile de conserver la pertinence biologique des images reconstruites et d'assurer l'exactitude de la méthode.

**Exactitude** Le critère visuel n'est évidemment pas suffisant pour permettre d'établir l'exactitude de la mesure. Cependant, et comme nous l'avons rappelé au paragraphe précédent, le signal de référence est par construction fidèle à la réalité : c'est-à-dire qu'il permet

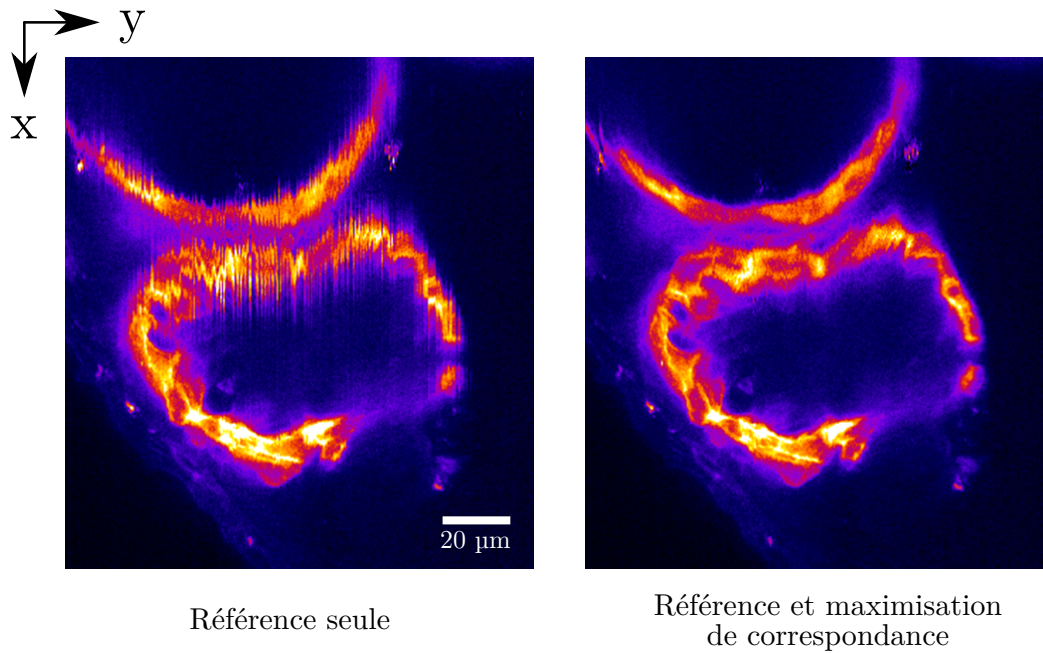


FIGURE 3.39: Reconstruction par méthode de référence seule comparée à la méthode référence couplée à la maximisation de correspondance. L'image de gauche a été obtenue par reconstruction via la méthode de référence uniquement. On observe sur les régions hautement dynamiques, des stries, correspondant à des erreurs de synchronisation temporelles mineures. L'image de gauche correspond à la méthode développée dans ce chapitre, permettant l'ajustement temporel grâce à la maximisation de correspondance des kymogrammes. Les stries n'apparaissent plus et confirment l'amélioration de la précision de cette synchronisation. 600 Hz; 512x332 px; résolution 0.41  $\mu\text{m}/\text{px}$ ; arl13b GFP.

d'estimer une valeur de déphasage centrée sur sa vraie valeur. Nous pouvons ainsi, pour estimer la dérive du déphasage induit par la référence, comparer le déphasage estimé par la maximisation de correspondance seule à celle obtenue par la référence. Pour ce faire, nous avons conduit l'expérience suivante, à partir d'une acquisition XTY, nous avons reconstruit l'image par deux méthodes : la première utilisant uniquement la méthode de maximisation de la correspondance, la seconde utilisant uniquement le signal de référence. De la sorte, il nous est possible d'estimer la dérive  $k_i$  de la phase au travers des lignes de l'image.

Le graphe 3.40 montre alors très clairement cette dérive de reconstruction par maximisation de la correspondance. Sur les bords notamment, on observe un décalage à la réalité, assuré par le signal de référence, d'une vingtaine de points temporels. Sur cette image, dont la période par ligne avoisine les 180 points temporels, cela correspond à un déphasage de plus de 10% à la réalité biologique. À la fréquence d'acquisition de 800 Hz utilisée ici, le décalage temporel entre le milieu et le bord de l'image est alors de 25 ms. Il est de fait clair que la reconstruction par maximisation de correspondance n'est pas *exacte*. Souvent, ce déphasage peut s'observer visuellement sur l'image reconstruite sous la forme de vagues artefactuelles.

**Estimation de la phase par référence et maximisation de correspondance** L'originalité de la reconstruction que nous avons implémentée réside dans l'action combinée de ces deux méthodes. En procédant ainsi, on conjugue leurs avantages respectifs : l'exactitude de la méthode de référence et la précision de l'ajustement fin par maximisation de correspondance (figure 3.40).

**Exactitude** Comme nous l'avons décrit précédemment, nous savons la méthode de reconstruction par référence *exacte* de par son implémentation. Ainsi, pour pouvoir qualifier la

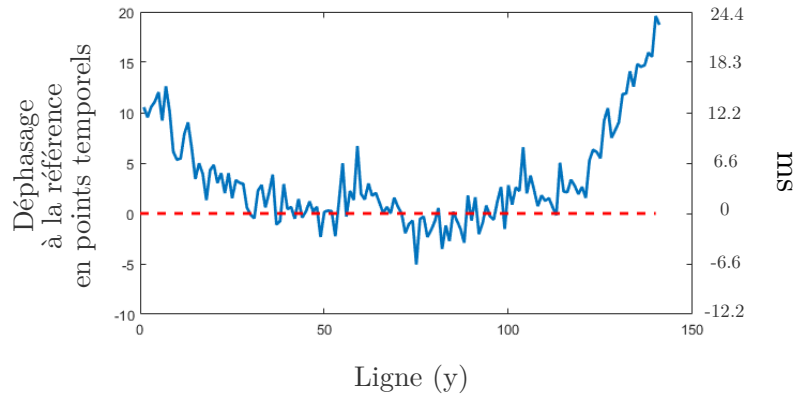


FIGURE 3.40: Estimation de la dérive de la phase de la reconstruction par maximisation de la correspondance, par rapport à la référence. Par le critère de similitude, la maximisation de correspondance tant à dériver de la vraie valeur de la phase. Aux bords de l'image, on constate un décalage de près de 20 points temporels par rapport à la phase réelle, sur une image de période  $T = 180$  points temporels. La méthode de reconstruction par maximisation de la correspondance est donc peu *exacte*.

reconstruction utilisant les deux méthodes successivement comme *exacte*, il revient à caractériser l'exactitude de la surcouche de maximisation de correspondance. Dans le paragraphe précédent, nous avons établi que la méthode de maximisation de corrélation induisait une dérive de la phase au travers des lignes  $y$ . En effet, l'information contenue dans des kymogrammes issus de lignes adjacentes est différente : nous essayons en réalité de synchroniser temporellement des images qui ne sont pas strictement identiques. L'algorithme mésestime le déphasage : les erreurs de synchronisation temporelle mineures invisibles à l'échelle d'une ligne à l'autre, se propagent cependant sur toute l'étendue en  $y$  de l'image. Dans le cas de leur action couplée, on procède d'abord à une synchronisation par la référence. Celle-ci, peu précise, est tout de même centrée pour chaque ligne autour de la véritable valeur du déphasage. Toutefois, la deuxième étape consiste en une synchronisation plus fine, par maximisation de la correspondance : malgré la synchronisation grossière préalable par la technique de référence, la méthode par correspondance renvoie toujours un déphasage dont les erreurs s'accumulent au fil des lignes.

La figure 3.41 illustre alors la technique mise en œuvre pour permettre de conserver la propriété d'exactitude de la reconstruction, malgré l'utilisation de la maximisation de correspondance. Comme on le remarque sur l'image (a), on peut dissocier deux composantes des déphasages estimés : d'une part, une composante haute-fréquence, qui correspond aux variations d'une ligne à l'autre permettant la correction des stries provoquées par la reconstruction par référence ; d'autre part, la lente dérive du déphasage, à basse-fréquence.

Ainsi, nous souhaitons conserver les déphasages d'une ligne à l'autre sans accumuler leur erreur. Pour ce faire, il suffit alors d'appliquer un filtre passe-haut sur le signal des déphasages en fonction de la ligne  $y$ , pour atténuer la propagation des erreurs ((b) de la figure 3.41, centrée autour de la référence). En procédant ainsi, on permet alors la correction des stries introduites par la reconstruction par référence, on conservant la caractéristique *exacte* de la reconstruction.

**Précision** Enfin, la reconstruction finale se doit d'être précise, c'est-à-dire que la dispersion des résultats autour de la valeur vraie soit faible. Pour caractériser la précision, nous avons alors utilisé une méthodologie particulière, détaillée à la figure 3.42. Elle consiste à reconstruire trois images indépendantes à partir d'un même jeu de donnée, dans le but de les

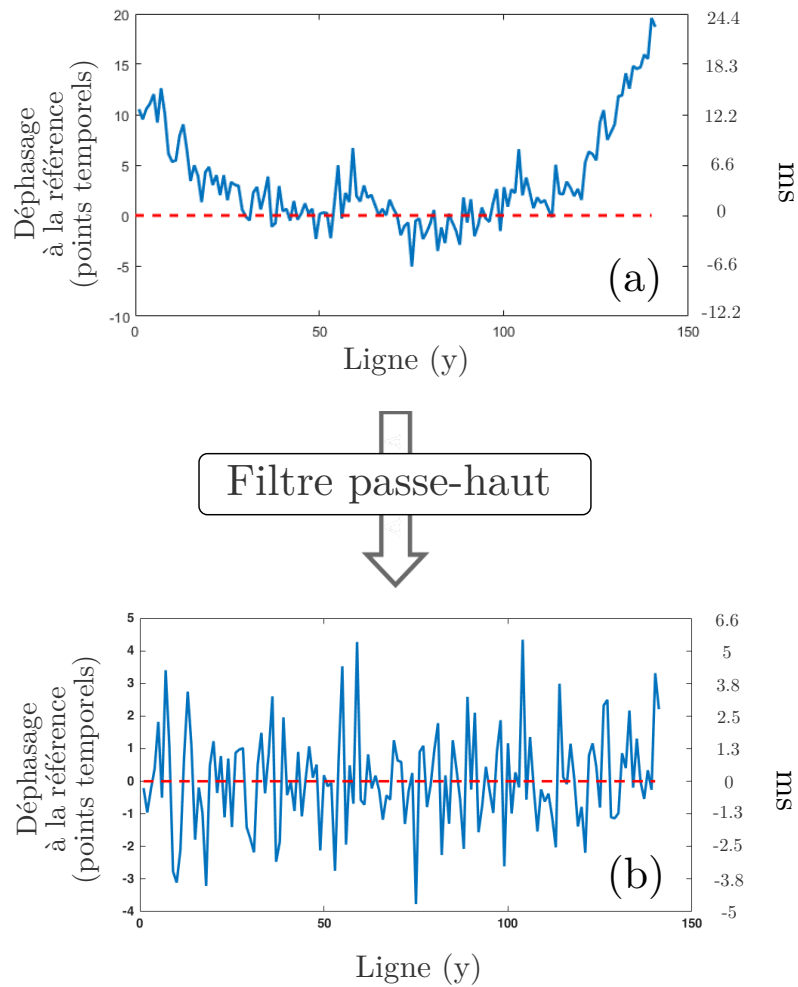


FIGURE 3.41: Utilisation d'un filtre passe-haut pour la synchronisation fine par maximum de correspondance. (a) Lorsque l'on applique la procédure de détermination de la phase par maximum de correspondance, l'algorithme renvoie des déphasages qui dérivent au travers de l'image. Pour conserver les modifications hautes fréquences, en rejetant la dérive, on applique un filtre passe-haut sur le signal des déphasages en fonction de la ligne  $y$  (b).

comparer.

On procède comme suit : à partir d'un jeu de données comportant un peu plus de trois cycles, nous avons scindé temporellement le kymogramme en trois. À partir de ces trois jeux de données tronqués d'à peine plus d'un cycle, nous procédons à la reconstruction par la méthode des deux techniques combinées. Comme l'illustre le (c) de la figure 3.42, les reconstructions semblent à l'œil identiques. Pour s'en convaincre d'avantage et permettre une comparaison visuelle plus poussée, nous avons superposé ces trois images en RGB (d). Avec cette méthode, on peut alors apprécier visuellement les zones se superposant, qui apparaissent alors en blanc. On peut également distinguer, en fonction des couleurs observées, si les différences proviennent d'un véritable décalage spatial ou (rouge, vert, bleu, ou mélanges de ces couleurs), ou alors d'une disparité d'intensité (toute autre couleur). Dans la majeure partie de l'image et tout au long de la séquence, la superposition RGB apparaît en blanc, ce qui confirme que les trois jeux de données tronqués indépendants ont été reconstruits en des images similaires. Pour s'en convaincre d'avantage, la figure 3.43 compare les déphasages estimés des trois jeux de données indépendants.

La déphasages ont alors été mis en comparaison afin d'en quantifier la dispersion : pour chaque ligne, les valeurs de déphasage ont été normalisés par la moyenne des valeurs des trois images. Cette manière de représenter les déphasages permet d'apprécier la dispersion des trois estimations en chaque ligne  $y$ . Comme le résultat visuel le suggérait, la reconstruction est précise à quelques points temporels près (au maximum 2). On peut alors dire de la reconstruction par les deux méthodes combinées qu'elle est à la fois *exacte* et *précise*.

Dans cette section, nous avons pu démontrer que la méthode d'estimation de la phase est critique aux bonnes performances de la reconstruction. La combinaison de l'utilisation de la référence et de la maximisation de correspondance constitue un élément original de notre approche et assure exactitude et précision de la reconstruction.

### 3.3.3 Robustesse aux apériodicités

Comme pour tout phénomène biologique, la périodicité du mouvement cardiaque est sujette à une certaine variabilité intrinsèque. Il est alors crucial de s'interroger sur la sensibilité de notre approche aux apériodicités de toute nature.

Comme il a été exprimé lors de la description de la méthode, le repliement de plusieurs cycles permettant de générer un cycle moyenné typique, comporte plusieurs avantages. D'abord, il permet d'uniformiser la période de chaque ligne, permettant ensuite leur recalage temporel, tout en repliant le signal sur très exactement un cycle de battement. À cette tâche s'ajoute une autre fonction utile à l'amélioration du signal reconstruit : le débruitage du signal. Dans cette section, nous aborderons d'abord les résultats associés à l'uniformisation et le moyennage des cycles, permettant d'atténuer l'impact des apériodicités cardiaques. Dans un second temps, nous détaillerons la méthode de débruitage, utile à maximiser le RSB de l'image tout en minimisant la phototoxicité pour l'échantillon observé. La première fonction du repliement est double. D'abord, parvenir à uniformiser la période de chaque cycle, qui peut varier lentement d'une ligne à l'autre ; en d'autres termes, être robuste aux **apériodicités interlignes**. Ensuite, estimer le cycle-type acquis au niveau d'une ligne, en s'affranchissant des apériodicités ponctuelles qui peuvent survenir au cours du balayage prolongé d'une unique ligne ; en d'autres termes, être robuste aux **apériodicités intralignes**.

**Apériodicités intralignes** Typiquement, l'acquisition XTY propose de balayer chaque ligne pour une durée de l'ordre de la seconde. Ainsi, pendant cette durée, nous pouvons observer en général moins d'une dizaine de cycles par ligne. À ces échelles de temps, les

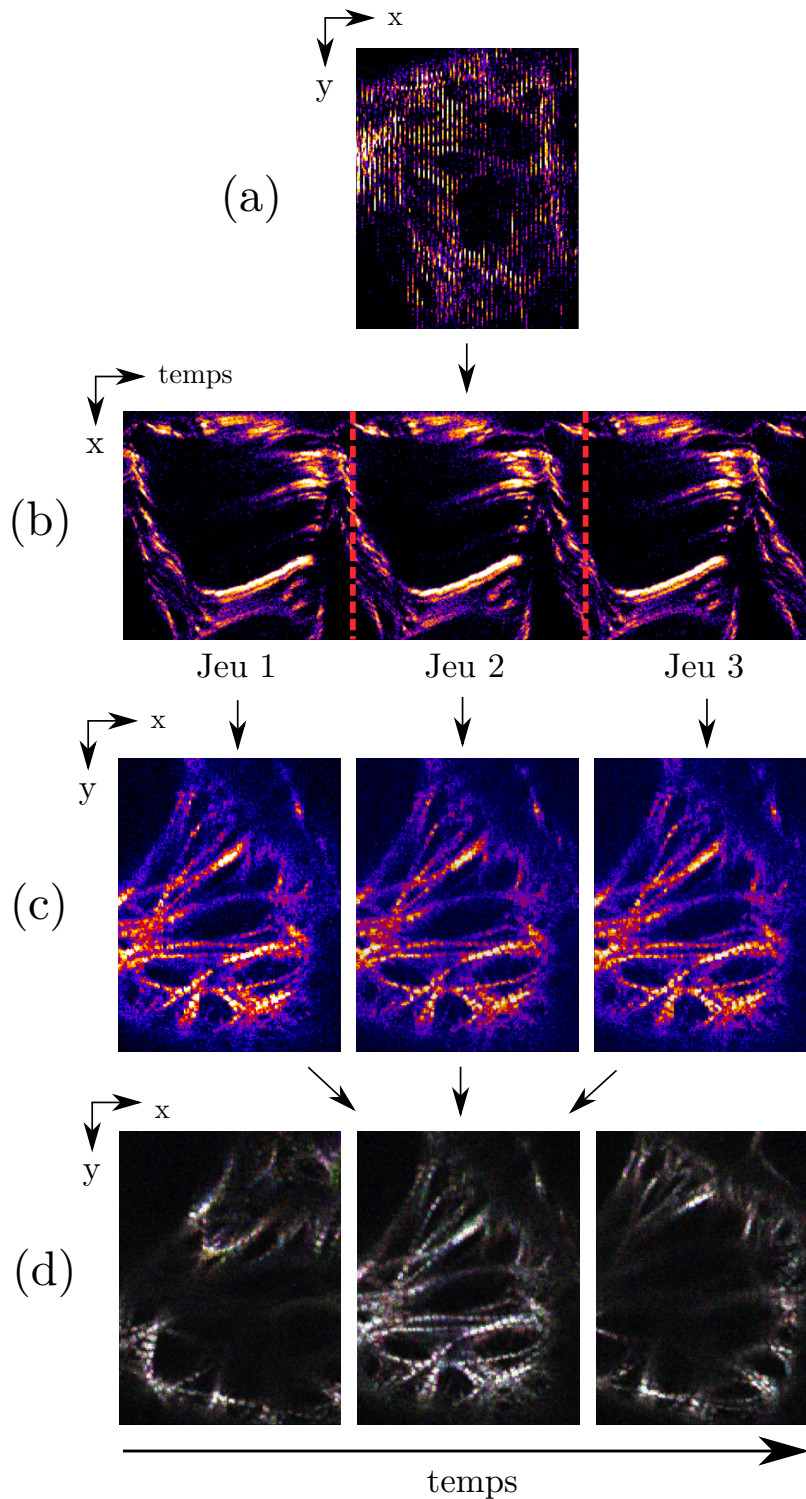


FIGURE 3.42: Caractérisation de la précision de la reconstruction par les deux méthodes combinées. (a) Le jeu de données de départ contient alors un peu plus de trois cycles. (b) Il est ensuite scindé temporellement en trois sous-kymogrammes, contenant à peine plus qu'un cycle. (c) Sur chacun d'entre eux, s'effectue la reconstruction par référence couplée à la maximisation de correspondance. (d) Il est possible en les superposant en RGB, d'observer les possibles différences entre les jeux de données. Ici, sont affichées trois images à des temps différents. Si la couleur renvoyée est blanche, cela signifie que les trois reconstructions se superposent parfaitement. Si certaines parties de l'image apparaissent en rouges, vertes ou bleues, ou les combinaisons de ces couleurs, cela signifie qu'il y a un décalage d'une ou plusieurs images par rapport aux autres. Toutes les autres couleurs peuvent-être issues des différences d'intensité entre les images.

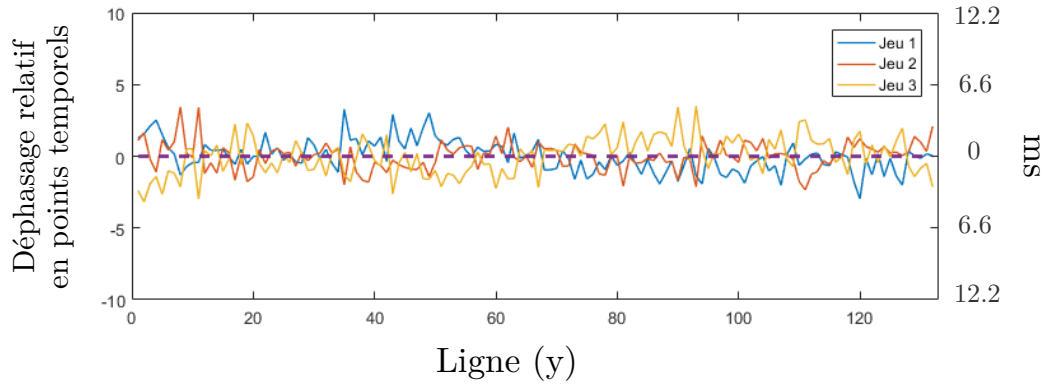


FIGURE 3.43: Courbes relatives du déphasage normalisé entre les trois images indépendantes reconstruites. La différence entre les déphasages est d'au maximum quelques points temporels.  $\lambda = 1090$  nm ;  $197 \times 141$  px ; résolution  $0.38 \mu\text{m}/\text{px}$  ; 800 Hz.

variations continues de la fréquence cardiaque, dues par exemple à un échauffement local sont négligeables. Cependant, il subsiste des apériodicités plus ponctuelles, temporelles ou spatiales, linéaires ou non, qui peuvent largement altérer la qualité de la reconstruction d'un kymogramme ( $xt$ ) associé à une ligne  $y$ . Par extension, elles peuvent être amenées à largement altérer la qualité globale de la reconstruction.

Comme décrit au chapitre introductif, les apériodicités peuvent être de plusieurs natures, agissant de manière différente sur le repliement d'un kymogramme. Pour illustrer ces phénomènes, la figure 3.44 expose les simulations pour 4 configurations que l'on peut retrouver lors du repliement d'un kymogramme sur un unique cycle :

- Un battement strictement périodique. Tous les cycles sont exactement de même période  $T$ .
- Un battement non-périodique linéaire temporellement. Tous les cycles sont exactement de même période  $T$ , à l'exception d'une qui est étirée linéairement temporellement, de période  $T + \Delta t$ .
- Un battement non-périodique non-linéaire temporellement. Tous les cycles sont exactement de même période  $T$ , mais un cycle est temporellement non-linéairement modifié.
- Un battement non-périodique spatialement. Tous les cycles sont exactement de même période  $T$ , mais un cycle est spatialement modifié.

La qualité du repliement est alors directement liée à la périodicité des quelques cycles contenus dans chaque ligne. Comme il est illustré à la figure 3.44, toutes les formes d'apériodicités induisent un floutage du kymogramme replié, de manière plus ou moins importante. Ce floutage se traduit dans la majeure partie des cas par une dégradation de la résolution temporelle, et donc par extension de la résolution spatiale. Malgré ceci et comme décrit dans la méthode, l'algorithme est tout de même robuste à ces quelques variations ponctuelles de la période sous certaines conditions. Lors du repliement, l'utilisateur peut choisir de fixer le nombre de périodes utiles à la reconstruction du cycle : par exemple, sur un kymogramme présentant 6 périodes, l'utilisateur peut choisir de ne conserver que les 4 qui se superposent le mieux. Ce tri est alors fait au sens du meilleur repliement par minimisation de la longueur de corde : l'algorithme essaie toutes les combinaisons possibles de repliement de 4 périodes parmi 6, et renverra celle qui propose la meilleure superposition. De par cette méthode, on peut alors rejeter certaines apériodicités ponctuelles qui pourraient altérer la qualité du cycle replié. En pratique, la sélection se fait assez naïvement : à partir du kymogramme contenant les 6 périodes, on découpe temporellement le signal en kymogrammes partiels de période  $T$



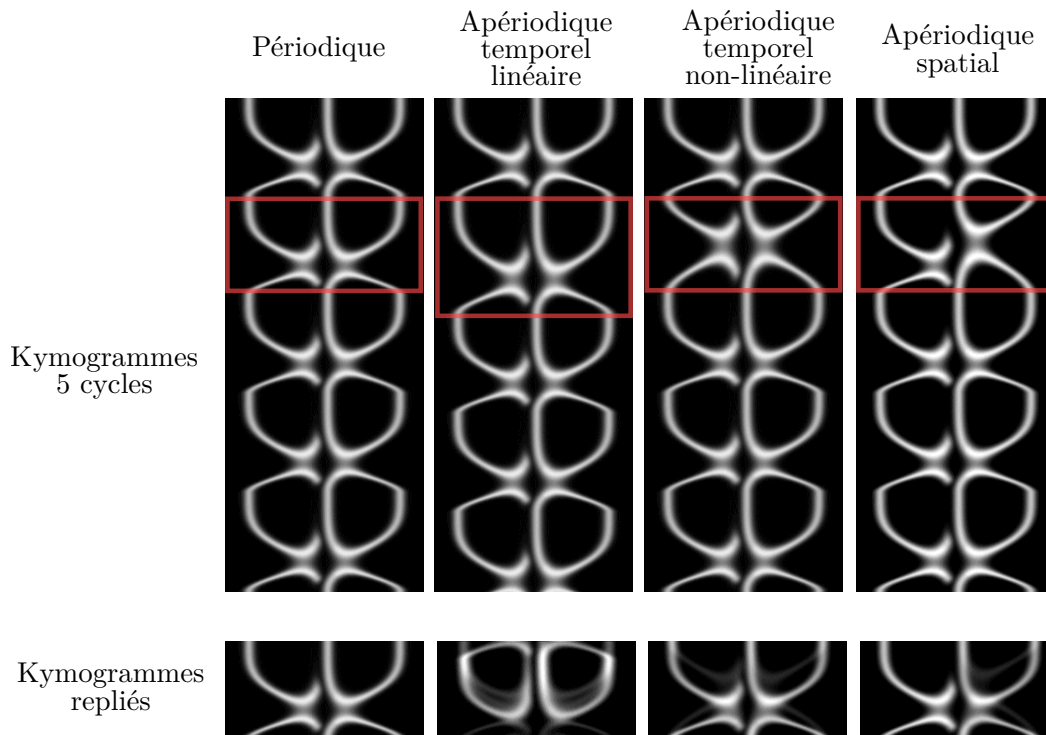


FIGURE 3.44: Influence des apériodicités sur le repliement des kymogrammes. Chaque kymogramme brut contient cinq cycles, dont le deuxième est caractéristique d’une apériodicité temporelle ou spatiale. En utilisant ces cinq cycles pour le repliement, les kymogrammes repliés présentent tous une forme plus ou moins visible de floutage.

estimée au préalable, sur lesquels la sélection des meilleures périodes va s’effectuer. Cependant, dans le cas d’une arythmie où l’une des périodes est de durée  $T + \Delta t$ , le découpage temporel sera simplement erroné ; d’autant plus qu’il survient dans les premiers cycles du kymogrammes. Dans ces conditions, le repliement va alors s’effectuer au moyen de kymogrammes ne représentant pas la même information temporelle, ce qui aura pour effet d’en dégrader le repliement.

En conclusion, les apériodicités non-linéaires ou spatiales ne sont pas le réel problème, tant qu’elles n’affectent que peu la durée des cycles au sein du kymogramme. Celles-ci pourront être aisément compensées au moyen d’une sélection astucieuse des périodes les plus pertinentes au repliement. L’image que nous proposons alors de reconstruire est une représentation du cycle typique de contraction, et pas celle d’un cycle de battement du coeur en tant que tel.

**Apériodicités interlignes** Les apériodicités ou arythmies interlignes se caractérisent par une lente variation de la fréquence de battement du coeur au cours de l’acquisition. Les échauffements en sont une cause possible, mais la fréquence cardiaque présente une variabilité intrinsèque au cours du temps qu’il est important de considérer, même en conditions physiologiques. Ces variations de périodes sont non seulement lentes, mais on constate qu’elles sont assez faibles, malgré de fortes variations externes de température notamment. La fonction d’estimation de période alliée au repliement permet alors de compenser ces variations et de permettre une reconstruction biologiquement pertinentes de coeur, selon son battement typique. Pour illustrer ceci, nous avons conduit une acquisition XTY, où l’embryon est soumis à une rampe de température. Nous induisons alors une augmentation de la fréquence de battement cardiaque par chauffage de la chambre contenant l’échantillon. Les résultats sont présentés figure 3.45.

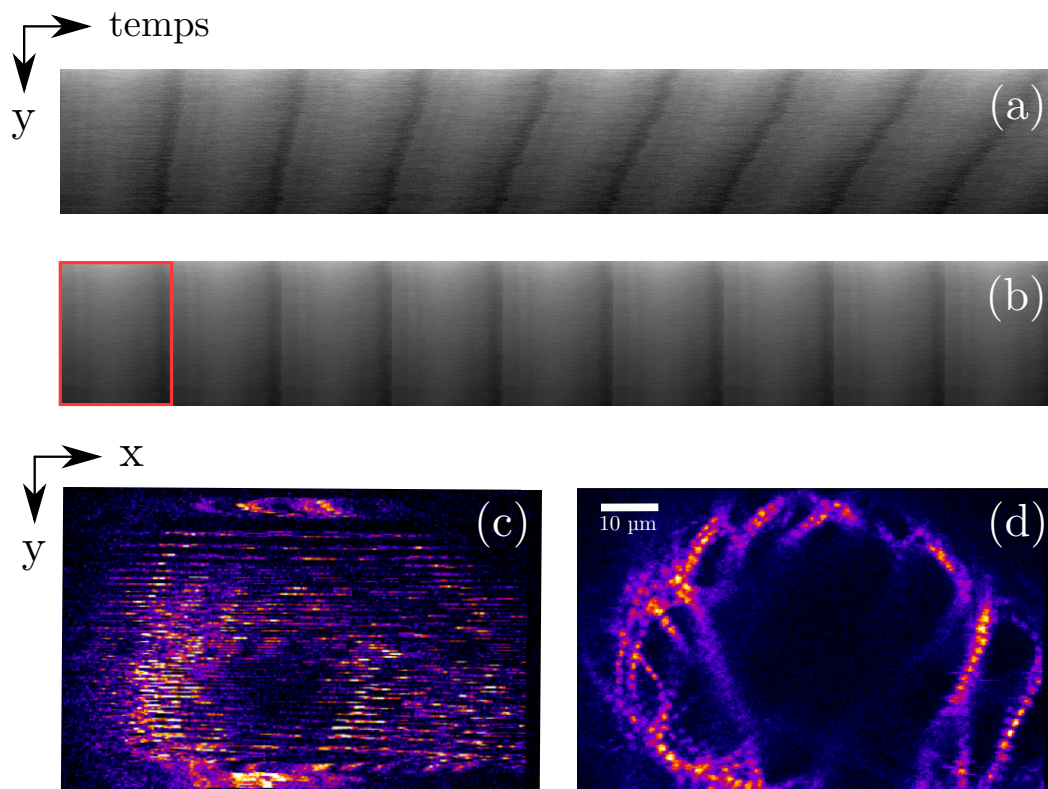


FIGURE 3.45: Repliement de cycles lors d'une augmentation de la fréquence cardiaque par échauffement entre 28 et 35°C. (a) représente les kymogrammes moyennés par ligne bruts de la référence. On observe clairement l'effet de l'échauffement appliqué, avec une augmentation de la fréquence cardiaque de l'ordre de 10%. (b) correspond au kymogramme associé des cycles repliés et dont la fréquence a été compensée et uniformisée. Le cycle typique est encadré en rouge. Les images (c) et (d) sont alors l'image non-synchronisée et celle qui l'a été au moyen de la méthode de reconstruction décrite dans ce chapitre. Malgré les fortes variations de température et donc de fréquence cardiaque, l'image est bien reconstruite grâce au repliement des cycles.

La procédure est la suivante : nous plaçons un échantillon sous le microscope, à température ambiante. Autour de l'échantillon est placée une chambre contrôlée en température : quelques minutes avant l'acquisition, la température de consigne est fixée à 35°C. Nous choisissons de passer environ 3 secondes par ligne pour prolonger le temps d'imagerie et pouvoir observer de manière claire la dérive de fréquence cardiaque. Pour acquérir les 200 lignes, l'acquisition prend alors 10 minutes au total. La température effective au niveau de l'échantillon est alors difficile à déterminer avec précision, celui-ci étant maintenu dans un dôme d'agarose, lui-même dans une solution de tricaine. Sur la figure 3.45, sont présentés les kymogrammes moyennés par ligne. En d'autres termes, chaque kymogramme associé à une ligne a été moyenné dans la direction spatiale  $x$ , pour ne conserver qu'une ligne caractéristique de la référence de l'acquisition de cette ligne. En les superposant, on obtient alors un kymogramme ( $yt$ ) grâce auquel l'on peut clairement observer la dérive de la fréquence cardiaque. Pour la première ligne, la période est d'environ 177 points temporels soit environ 220 ms, alors que la dernière ligne correspond à une période de 155 points temporels, soit 195 ms. Cela équivaut à une accélération de la fréquence de battement cardiaque de 10%.

Grâce à l'estimation de la période et au repliement de ces cycles, il est possible compenser ces disparités interlignes. Le kymogramme ( $yt$ ) présenté en (b) est alors le résultat de cette opération : le cycle encadré en rouge représente le cycle typique de la référence obtenu par

repliement, dont les périodes sont uniformisées et le signal débruité. Les variations interlignes ont alors été effacées, et permet la synchronisation a posteriori de l'image (c) en (d).

**Pertinence biologique de la correction des arythmies** L'expérience d'échauffement présentée soulève la question importante de la pertinence biologique d'une compensation des disparités de fréquence de battement cardiaque entre les lignes. Physiologiquement, il n'est pas évident qu'un battement à 3Hz soit équivalent, spatialement ou temporellement, à un battement à 5Hz. Pour répondre à cet argument, nous pouvons apporter plusieurs explications. D'abord, l'objectif principal de la méthode XTYZ est avant tout de reconstruire une *image typique* du battement cardiaque. Ainsi, la méthode s'affranchit par construction des variations internes, ponctuelles ou non, et biologiquement pertinente d'un cœur battant. Par ailleurs, il est à noter que la référence nous permet de quantifier cette information de régularité et de dispersion des battements : en les corrigeant, nous avons du même fait un indicateur précis de ces arythmies cardiaques. Cette information nous est également disponible, et permet une quantification précise de la dynamique cardiaque au cours du temps.

### 3.3.4 Débruitage par repliement de cycles : phototoxicité et signaux faibles

Dans la pratique, nous utilisons le signal provenant de plusieurs cycles pour reconstruire un battement typique. Procéder ainsi présente un avantage de taille : cela permet, en allongeant le temps d'acquisition, d'augmenter le rapport signal à bruit (RSB) de l'image. Cela permet alors de travailler avec des signaux faibles (THG, fluorescence endogène) ou simplement de réduire la puissance moyenne utilisée à l'imagerie de l'échantillon et ainsi limiter une éventuelle phototoxicité. Ainsi, la méthode propose de par son implémentation une fonction de débruitage intrinsèque, par repliement de cycles.

Dans le cas des acquisitions classiques XYZT, le RSB dépend du temps passé sur chaque pixel, de la chaîne d'amplification, mais surtout de la puissance laser incidente. Le débruitage de l'image par le repliement des cycles est une fonctionnalité annexe qui permet l'amélioration du RSB sans ajout d'étape dédiée spécifiquement à cette tâche. Conceptuellement, cela revient à utiliser le signal accumulé sur plusieurs périodes et de le condenser en un unique cycle de bonne qualité. Cette contrainte pousse souvent l'expérimentateur à augmenter cette dernière, ce qui peut porter des dommages phototoxiques à l'échantillon (échauffements, arythmies, voire dégradation des tissus ou mort de l'embryon). Dans le cas d'acquisitions XTYZ, nous montrons que le processus de débruitage des acquisitions longues permet de conserver une qualité d'image nécessaire à l'analyse qualitative des processus biologiques sans en altérer le fonctionnement par l'illumination.

Le signal SHG provient d'un processus quadratique, c'est-à-dire que le signal collecté est proportionnel au carré de l'intensité laser. Ainsi, lorsque l'on divise la puissance laser par 2, on obtiendra 4 fois moins de signal utile. La contribution du bruit (correspondant à la variance du signal de fond) quant à elle ne dépend que de la chaîne de détection de d'amplification. Ainsi, la figure 3.46 expose les différentes images recueillies à respectivement 10, 15 et 30% de puissance laser (respectivement 14, 21 et 42 mW au niveau de l'objectif).

Sur les trois lignes de cette figure sont présentés différentes représentations de ces acquisitions, à puissances différentes. Sur la première ligne, le contraste est identique pour les trois images : on remarque naturellement que plus la puissance laser est élevée, plus le signal est intense, et ce de manière quadratique. Malgré cela, pour se convaincre du gain de RSB lorsqu'on augmente la puissance laser, il suffit d'ajuster le contraste de l'image en le normalisant par rapport au maximum d'intensité. En pratique, l'image de gauche a été obtenue à partir de 3 fois moins de puissance que celle de droite : son intensité moyenne utile est alors 9 fois

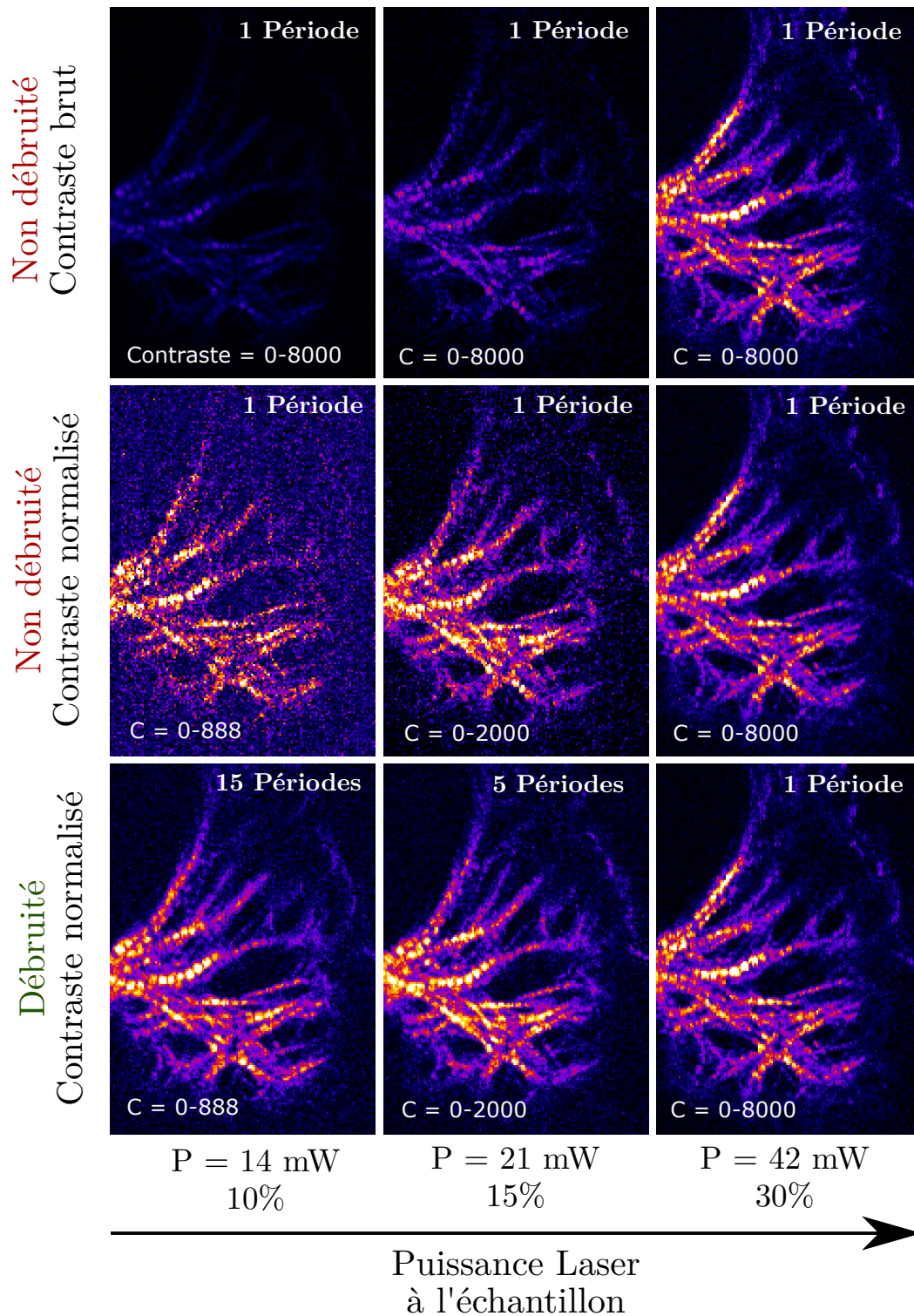


FIGURE 3.46: Effet du repliement du cycle cardiaque et récupération du RSB par débruitage. La première ligne correspond aux images non débruitées, pour lequel le contraste est identique. On observe que, plus la puissance laser est élevée, plus le signal est intense. La seconde ligne correspond alors aux mêmes images, mais dont le contraste a été normalisé. Ainsi, la première image ayant été acquise avec 3 fois moins de puissance laser, l'intensité moyenne du signal utile est 9 fois moindre. Pour compenser ceci, le contraste de l'image a été ajusté pour proposer une dynamique équivalente à ces trois niveaux de puissance. On remarque alors que le RSB s'améliore nettement avec une puissance plus forte. La dernière ligne correspond alors aux images débruitées au moyen du repliement de plusieurs cycles. Ici encore, le contraste a été normalisé pour mettre une comparaison des signaux les plus intenses de chaque image. On constate une amélioration drastique du RSB pour l'acquisition à faible puissance, mais repliée à partir de 15 cycles.  $\lambda = 1090$  nm ;  $197 \times 141$  px ; résolution  $0.38 \mu\text{m}/\text{px}$  ; 800 Hz.

inférieure. Pour obtenir alors une dynamique équivalente sur les deux images, on ajuste l’affichage en conséquence. On note alors que le bruit altère largement le rendu de l’image lorsque la puissance est plus faible. Le débruitage permet alors de compenser la perte du RSB en utilisant le signal collecté au cours de plusieurs cycles. Il suffit alors de passer plus de temps sur chaque ligne, afin d’observer plusieurs cycles du mouvement périodique. Dans le cas de cet échantillon, le cœur battait environ 4 fois par seconde. De fait, pour l’image acquise à 10% de puissance laser, nous avons collecté le signal d’une ligne pendant 4 secondes, c’est-à-dire pendant environ 16 cycles. Pour celle à 15% de laser, nous avons passé 1.5 secondes par ligne, soit 6 périodes. Enfin, l’acquisition à 30% de puissance a été obtenue en s’attardant 0.5 seconde par ligne, correspondant à 2 périodes environ. La dernière ligne de la figure correspond alors aux images débruitées, utilisant respectivement 15, 5 et 1 cycles pour le repliement. Visuellement, les résultats sont très convaincants : l’image basse puissance voit son RSB augmenté de manière drastique, permettant notamment de distinguer les sarcomères de manière mieux résolue que sur l’image brute non débruitée. La figure 3.47 détaille l’analyse des fréquences spatiales grâce à la transformée de Fourier de trois images clés : l’image brute acquise à 10% de puissance et l’image débruitée associée, ainsi que l’image acquise à 30% de puissance laser. Cette représentation permet de comparer l’éventuel gain de résolution spatiale et de RSB.

La représentation fréquentielle de l’image permet de dégager plusieurs informations. Visuellement d’abord, on observe une similitude forte entre les images (b) et (c). L’image (a), dont le RSB est notablement moins fort, confirme cette observation de par la forte contribution des hautes fréquences spatiales (caractéristiques du bruit). Par ailleurs, on remarque un anneau d’intensité plus forte autour du centre, et ce sur les trois images. Les images (d) (e) et (f) permettent de distinguer nettement cette forte contribution spectrale autour de  $2 \mu\text{m}$  par cycle, correspondant à la longueur caractéristique de la distance inter-sarcomères. Pour poursuivre l’analyse de manière quantitative, nous procédons comme suivant : sur les images de la figure 3.46, les fibres musculaires sont pour la plupart orientées entre  $+40^\circ$  et  $-40^\circ$  par rapport à l’axe horizontal. Ainsi, pour maximiser la contribution spectrale des sarcomères, nous appliquons un masque sur l’image (g), avant de moyennner angulairement la densité spectrale de l’image en fonction de la distance à la composante continue, c’est-à-dire le centre de l’image (h). Les courbes ainsi obtenues sont normalisées par le maximum d’intensité du pic correspondant au signal utile (distance inter-sarcomères). Le graphe (h) permet alors d’estimer qualitativement les disparités de RSB entre les différentes images. Puisque les courbes sont normalisées par rapport au signal utile localisé aux alentours de  $2 \mu\text{m}$  par cycle (soit  $0.5 \mu\text{m}^{-1}$ ), la différence en terme de RSB correspond alors à la contribution du bruit, assimilable à la densité spectrale des hautes fréquences spatiales. Il apparaît alors clairement que l’image basse puissance non débruitée contient beaucoup de hautes fréquences spatiales, baissant ainsi le RSB. La différence entre l’image repliée à 10% de laser et celle brute à 30% est plus ténue, mais permet de déterminer que le RSB est meilleur pour cette dernière acquisition.

Ceci s’explique par ailleurs numériquement : l’intensité du signal utile dépend quadratiquement de la puissance d’excitation. De fait, diminuer la puissance d’un facteur 3 revient à diminuer le signal d’un facteur 9, et par extension, le RSB d’autant. Le gain de RSB apporté par le moyennage de périodes peut-être décrit comme étant en  $\sqrt{N}$  où  $N$  est le nombre de cycles utilisés pour le repliement, par effet de moyennage. Ainsi, il faudrait alors  $N = 9^2 = 81$  périodes pour retrouver un RSB équivalent. Dans ce cas précis où nous utilisons 15 périodes, nous gagnons approximativement un facteur 4 par rapport à l’image brute.

**Problème des acquisitions longues** Naturellement, l’amélioration du RSB se fait au détriment de certains autres aspects d’imagerie. L’aspect le plus problématique demeure la durée des acquisitions : lorsque l’on souhaite débruiter le signal, il faut nécessairement allonger le temps passé par ligne, ce qui a une influence directe sur le temps d’acquisition totale.

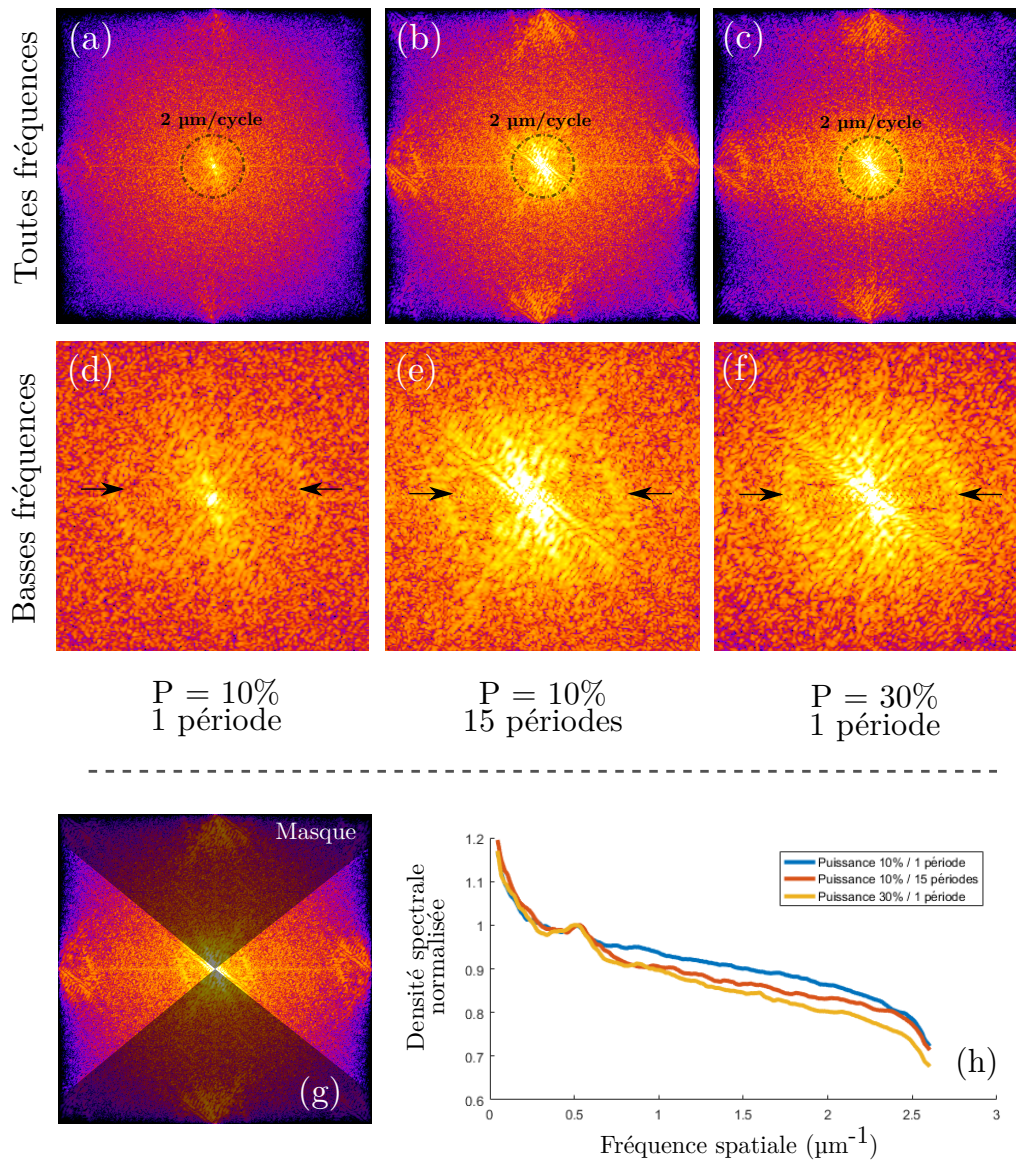


FIGURE 3.47: Analyse fréquentielle de l'étape de débruitage. Les images (a), (b) et (c) correspondent à la transformée de Fourier discrète spatiale des images à  $P = 10\%$  brute, à  $P = 10\%$  débruitée, et à  $P = 30\%$  brute. On y observe une plus forte contribution des hautes fréquences spatiales associées au bruit pour l'image (a), quand les images (b) et (c) sont d'aspect similaire. Les images (d), (e) et (f) exposent plus précisément les basses fréquences spatiales : on distingue assez nettement un anneau plus intense, correspondant à la distance inter-sarcomères (environ  $2 \mu\text{m}$  par cycle). Pour en permettre l'analyse, on applique un masque (g) permettant de ne considérer que les orientations correspondant à celles des fibres musculaires. Le graphe (h) est alors la projection angulaire des intensités de la transformée de Fourier en fonction de la distance à la composante continue (centre de l'image). Les courbes ont été normalisées par rapport à l'intensité maximale du pic correspondant à la fréquence inter-sarcomères.

Intuitivement, acquérir deux fois plus de cycles par ligne revient simplement à doubler le temps d’acquisition. Quand cette manière de procéder est anodine pour des jeux de données de tailles raisonnables, cela pose de nombreux problèmes lorsque les acquisitions sont plus volumineuses, comme c’est le cas des volumes XTYZ. Dans ces circonstances, la qualité de reconstruction de l’image peut être largement dégradée par plusieurs phénomènes.

Le premier peut concerner la **dérive spatiale** de l’échantillon sous le microscope. En effet, il n’est pas rare que l’embryon se déplace très lentement dans l’agarose (chaleur de la pièce ou sous le microscope), à des vitesses de l’ordre du micron par heure. Pour la plupart des acquisitions classiques, cette dérive n’est jamais un problème tant les échelles temporelles d’acquisitions sont courtes (de l’ordre de la minute pour un volume simple en XYZT). En revanche, dans le cas d’une acquisition XTYZ, en particulier lorsque l’on souhaite acquérir plusieurs cycles par ligne pour le débruitage, l’imagerie d’un volume entier peut dépasser l’heure d’acquisition.

À de telles échelles de temps, l’acquisition XTYZ devient sensible à la **morphogenèse** : l’embryon a le temps de se développer et l’image obtenue sera alors modulée par le développement cardiaque. Il est alors crucial d’être prudent à ne pas trop allonger le temps d’acquisition, et de s’assurer de reconstruire une image biologiquement pertinente d’un état physiologique réel.

**Application : signaux faibles et phototoxicité** Le débruitage peut être appréhendé de deux manières différentes. D’un côté, à puissance constante, il permet d’améliorer le RSB de l’image. De l’autre, à RSB constant, il permet de diminuer la puissance excitatrice. Par ce principe, les applications du débruitage sont multiples et font écho au pentagone de la frustration (figure 3.28) décrit précédemment. Le compromis initialement imposé par les acquisitions classiques est rendu plus souple par la possibilité d’augmenter la durée d’acquisition, et ainsi récupérer le signal par repliement. Ainsi, suivant les contraintes portées par l’imagerie, le débruitage permet d’apporter d’avantage de flexibilité aux acquisitions. D’une part, il peut permettre de réduire la phototoxicité au niveau de l’échantillon, de l’autre, elle peut permettre de révéler des signaux dont l’intensité est très faible, à l’instar de la génération de signal de troisième harmonique (THG).

**Phototoxicité** La quantification de la phototoxicité fait toujours débat dans le monde de la microscopie, et a fortiori en imagerie multiphoton [63]. Par ailleurs, il est légitime de s’interroger sur l’influence d’un balayage répété d’une même ligne et les dommages potentiellement photoinduits. Dans le principe général, il semble clair qu’il est préférable pour l’échantillon de limiter le nombre de répétitions successives du laser : la méthode XTYZ paraît alors, dans son concept, plus nocive pour l’échantillon qu’une acquisition standard. Cependant, et comme il l’a été démontré à la figure 3.46, il est possible d’allonger la durée de l’acquisition, afin de pouvoir conserver un même niveau de signal alors que l’on diminue la puissance laser incidente. De fait, il est toujours possible de préserver l’intégrité de l’échantillon en limitant la puissance laser, sans pour autant compromettre la qualité de l’image (RSB, résolutions, champ de vue).

**Signaux faibles** Au cours des acquisitions décrites précédemment, l’intensité du signal est rarement un problème. En fluorescence d’abord, le signal est abondant et permet de reconstruire une image de très bonne qualité à des puissances laser inoffensives pour l’embryon. En SHG en revanche, le débruitage permet une amélioration nette du RSB de l’image. Pour les signaux plus faibles, comme la THG ou les signaux de fluorescence endogène, le débruitage est alors critique (figure 3.48).

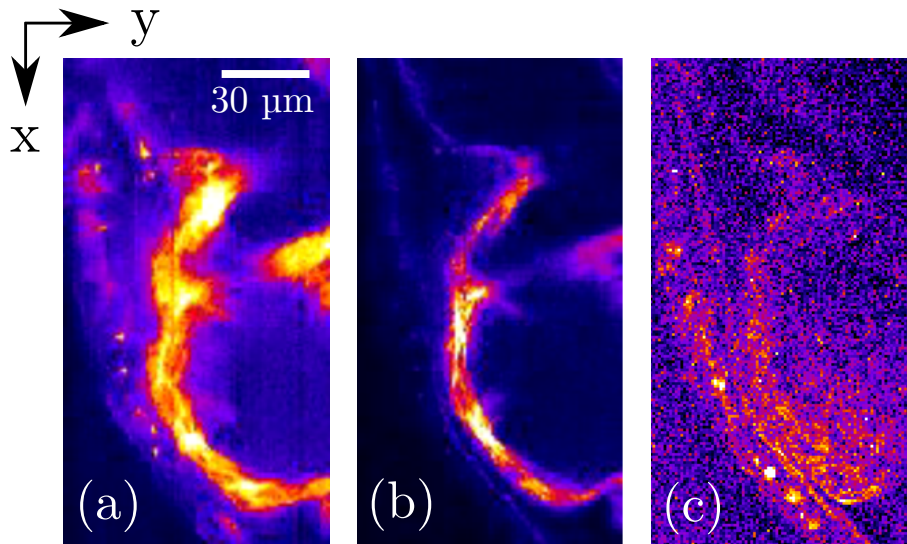


FIGURE 3.48: Reconstruction d'une image en fluorescence, SHG et THG, 600 Hz. (a) Signal de fluorescence. (b) Signal SHG. (c) Signal THG. 2 secondes par ligne; 180x96 px; 1.0  $\mu\text{m}/\text{px}$ ;  $\lambda = 1150$  nm.

### 3.3.5 Suivi dynamique des sarcomères au cours de la contraction cardiaque par microscopie SHG

Nous disposons d'un outil permettant l'imagerie SHG tridimensionnelle à plus de 1000 Hz des échantillons biologiques. Afin d'exploiter le potentiel de cette approche, nous proposons dans la suite de suivre dynamiquement la contraction des sarcomères *in vivo* au sein du muscle cardiaque. Comme énoncé dans la section introductive 3.1.2, la contraction cardiaque n'a pas été étudiée dynamiquement à l'échelle du sarcomère. Nous profitons ici du contraste SHG pour les révéler avec une très bonne spécificité spatiale, et de la méthode XTYZ pour obtenir la résolution temporelle nécessaire à leur suivi dans le temps. Dans cette section, nous allons illustrer le potentiel de la méthode, dans un premier temps à la caractérisation de la taille des sarcomères de manière statique, puis en démontrant que le suivi de la contraction d'un sarcomère isolé est possible dynamiquement. Finalement, nous appliqueront la méthode à l'étude préliminaire de la contraction des fibres du coeur chez un modèle de myopathie cardiaque.

**Caractérisation statique** Comme présenté en introduction 3.1.2, le sarcomère individuel a souvent été étudié de manière statique, par diverses techniques d'imagerie. Si l'on exclut les techniques de déclenchement prospectif, il est alors principalement question d'arrêter le coeur le temps de l'acquisition pour en faire une image. C'est notamment ce qui a été fait, au moyen d'une surdose de tricaine permettant d'arrêter le coeur de l'embryon de poisson, pour obtenir l'image 3.49. Cette image statique a été acquise sur le dispositif TriMScope (sur lequel nous procédons par ailleurs aux acquisitions XTYZ) par Guy Malkinson au moment du début de ce projet. Elle permet d'illustrer que le signal provenant du muscle cardiaque est assez intense et résolu pour distinguer les sarcomères individuels; la qualité de ces images est le résultat direct de l'optimisation du dispositif pour l'imagerie SHG détaillé en 3.2.2.1.

À partir de ces images, certaines caractérisations ont été menées, comme notamment l'estimation de la distance inter-sarcomère. La figure 3.50 illustre le type de quantification qu'il a été possible de réaliser grâce au contraste SHG sur coeur arrêté. La bonne résolution spatiale et le fort RSB dont nous disposons sur ces images nous permettent alors de repérer



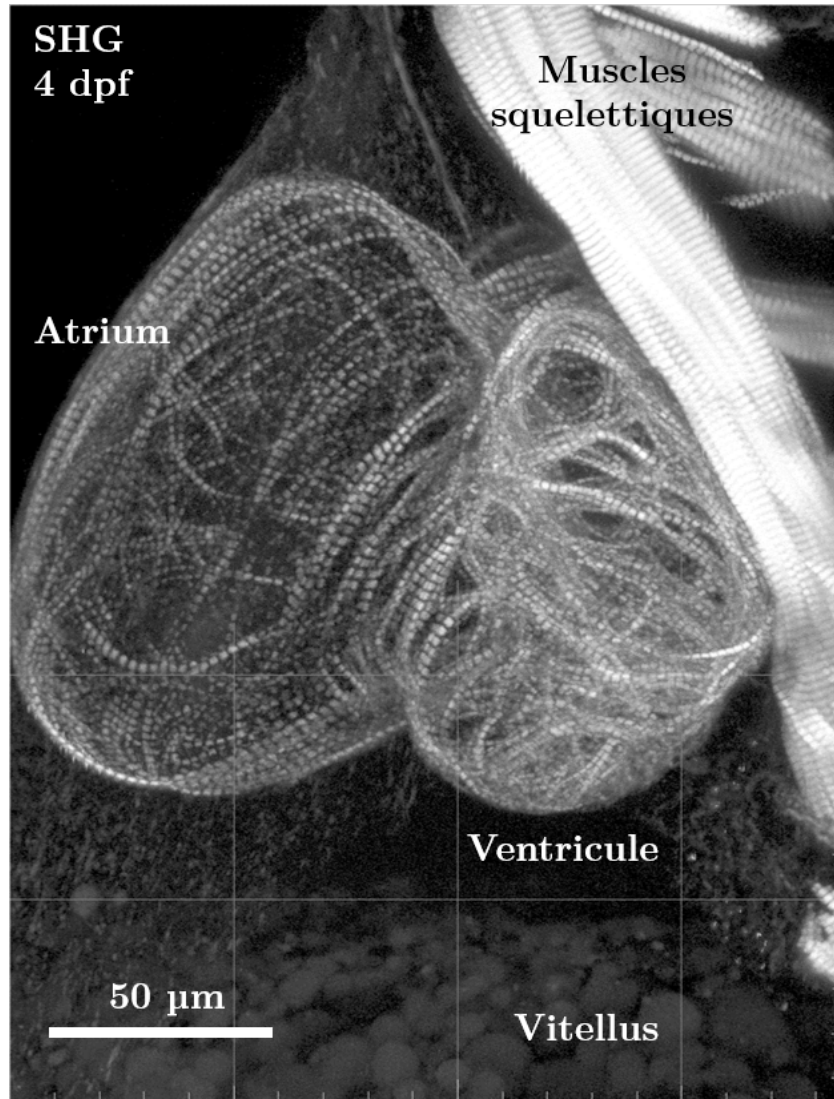


FIGURE 3.49: Acquisition 3D du cœur arrêté en SHG.

la structure en M caractéristique de la structure des sarcomères.

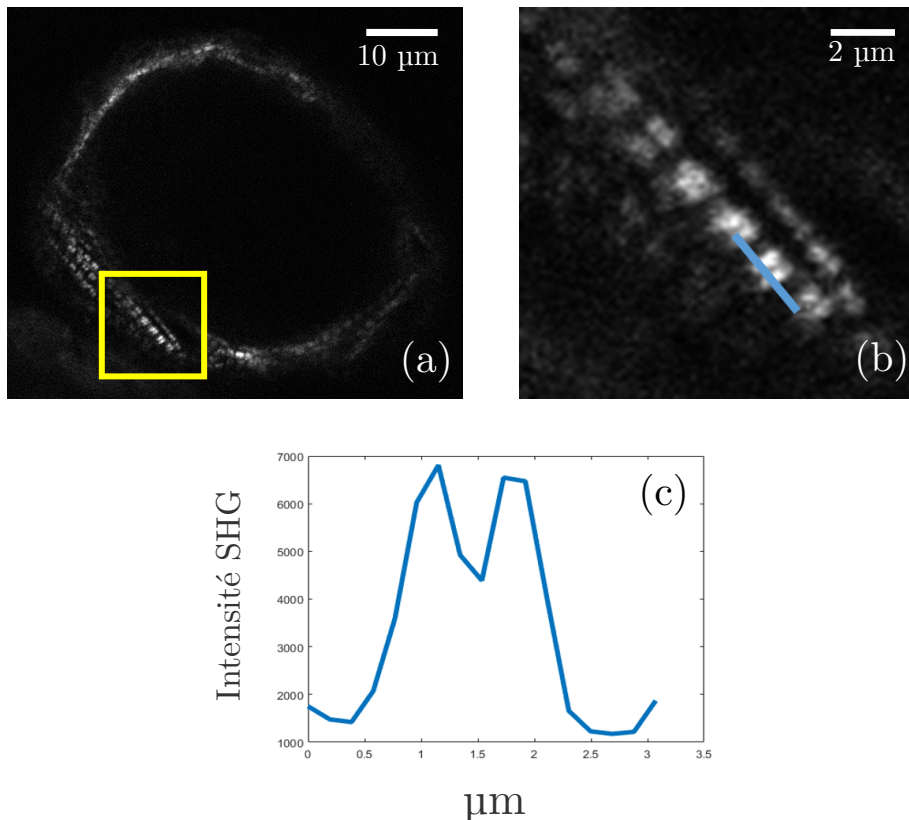


FIGURE 3.50: Caractérisation des sarcomères à partir d'une acquisition statique. (a) Plan SHG d'un cœur statique. Il est possible de distinguer les sarcomères individuels. (b) Image agrandie d'une fibre, où l'on peut repérer l'écartement entre les filaments de myosine correspondant à la ligne M. (c) Profil d'intensité de la fibre, permettant de distinguer la forme en "M" caractéristique du sarcomère.

Le principal grief que l'on pourrait adresser à cette technique est que l'on perturbe le fonctionnement du cœur ; le sarcomère ainsi étudié n'est pas nécessairement dans un état physiologique et il est difficile d'établir s'il est complètement relâché ou non. Pour contourner ce problème, nous avons conduit cette même caractérisation statique sur nos jeux de données dynamiques reconstruits. En procédant de la sorte, il suffit de sélectionner une fibre contenue dans le plan lors de sa phase décontractée afin de mesurer la longueur des sarcomères la composant. Un exemple de caractérisation statique est proposé sur un jeu de données dynamique à 800 Hz à la figure 3.51. La résolution et l'échantillonnage sont alors suffisants pour distinguer la forme en M caractéristique des sarcomères, même pour nos acquisitions dynamiques, et l'on n'observe aucun flou cinétique sur les images. Nous pouvons de fait estimer à nouveau la distance typique des sarcomères visuellement : sur l'image, 5 sarcomères correspondent à une distance d'environ 11.7 μm, soit 2.3 μm par sarcomère. Cette valeur est alors cohérente avec les mesures antérieures, sur le cœur arrêté notamment.

**Caractérisation dynamique** Naturellement, l'étape qui suit est de suivre ces mêmes fibres dynamiquement, afin d'en caractériser la contraction au cours du cycle. Certains travaux proposent de suivre une unique fibre en SHG grâce à un balayage en ligne [36], permettant de suivre avec une très bonne résolution temporelle leur contraction. Cependant, cette technique exige de balayer très exactement dans la direction d'une fibre et que la contraction s'effectue strictement le long de cette ligne balayée. Dans notre cas, il nous est possible de suivre plusieurs fibres au sein de l'image, pour peu qu'elles restent dans le volume de l'acquisition. En général, nous essaierons de considérer les fibres dans le plan (xy) de l'imagerie, bien que

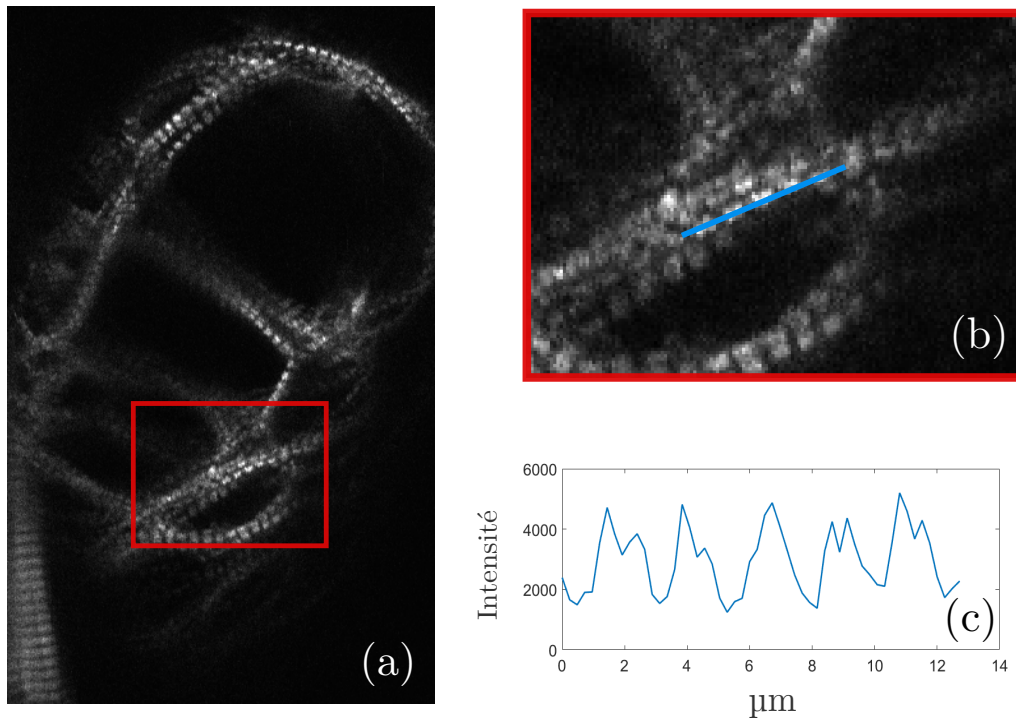


FIGURE 3.51: Caractérisation statique des sarcomères à partir d'une acquisition dynamique. (a) Image d'une acquisition dynamique à 800 Hz. Il est possible de différencier les sarcomères individuels. (b) Image agrandie d'une fibre, où l'on distingue l'écartement entre les filaments de myosine correspondant à la bande H. (c) Profil d'intensité de la fibre, permettant de distinguer la forme en "M" caractéristique du sarcomère.  $\lambda = 900 \text{ nm}$  ;  $336 \times 626 \text{ px}$  ;  $0.24 \text{ } \mu\text{m/px}$  ;  $800 \text{ Hz}$  ; période  $246 \text{ ms}$ .

nos reconstructions volumiques permettent de suivre les fibres se déplaçant légèrement dans la direction Z.

**Suivi des sarcomère au cours d'un cycle complet** Comme nous venons de l'observer, les images dynamiques dont nous disposons présentent une résolution spatiale nous permettant de résoudre les sarcomères individuels. À ceci s'ajoute une excellente résolution temporelle, nous permettant le suivi d'une fibre tout au long de son cycle de contraction. Ainsi, la configuration idéale est telle que celle-ci demeure au sein du même plan tout au long du cycle. La figure 3.52 expose la quantification de trois fibres contenues au sein de la même image reconstruite, se contractant au sein du plan d'imagerie. La distance entre sarcomères a été déterminée au moyen d'un pointé manuel de leur position au cours du temps sur Fiji. Pour ce faire, nous avons repéré manuellement les sarcomères de la même fibre, que l'on peut suivre tout au long de la contraction. Un des enjeux est de disposer de la résolution nécessaire pour distinguer les sarcomères individuels lorsqu'ils sont en phase contractée, et donc plus resserrés. Dans la pratique, bien qu'il ne soit pas toujours très clair de distinguer la séparation des sarcomères lors de la phase contractée (b), il est toujours possible d'estimer la position du sarcomère relativement à la contraction de la fibre entière. Visuellement, nous pouvons donc repérer la position du sarcomère considéré, quand bien même la résolution n'est pas suffisante pour différencier deux sarcomères proches à l'état contracté.

Les suivis de ces trois fibres sont regroupés au graphe (c), qui décrivent la taille d'un unique sarcomère au cours du temps. Les points de couleurs représentent la série de pointés associés à une même fibre, quand la courbe violette indique la moyenne des mesures en chaque point. On remarque alors que la taille typique du sarcomère varie entre  $1.5 \text{ } \mu\text{m}$  et  $2.2 \text{ } \mu\text{m}$ , soit une contraction correspondant à environ 35% de sa longueur totale. On peut trouver

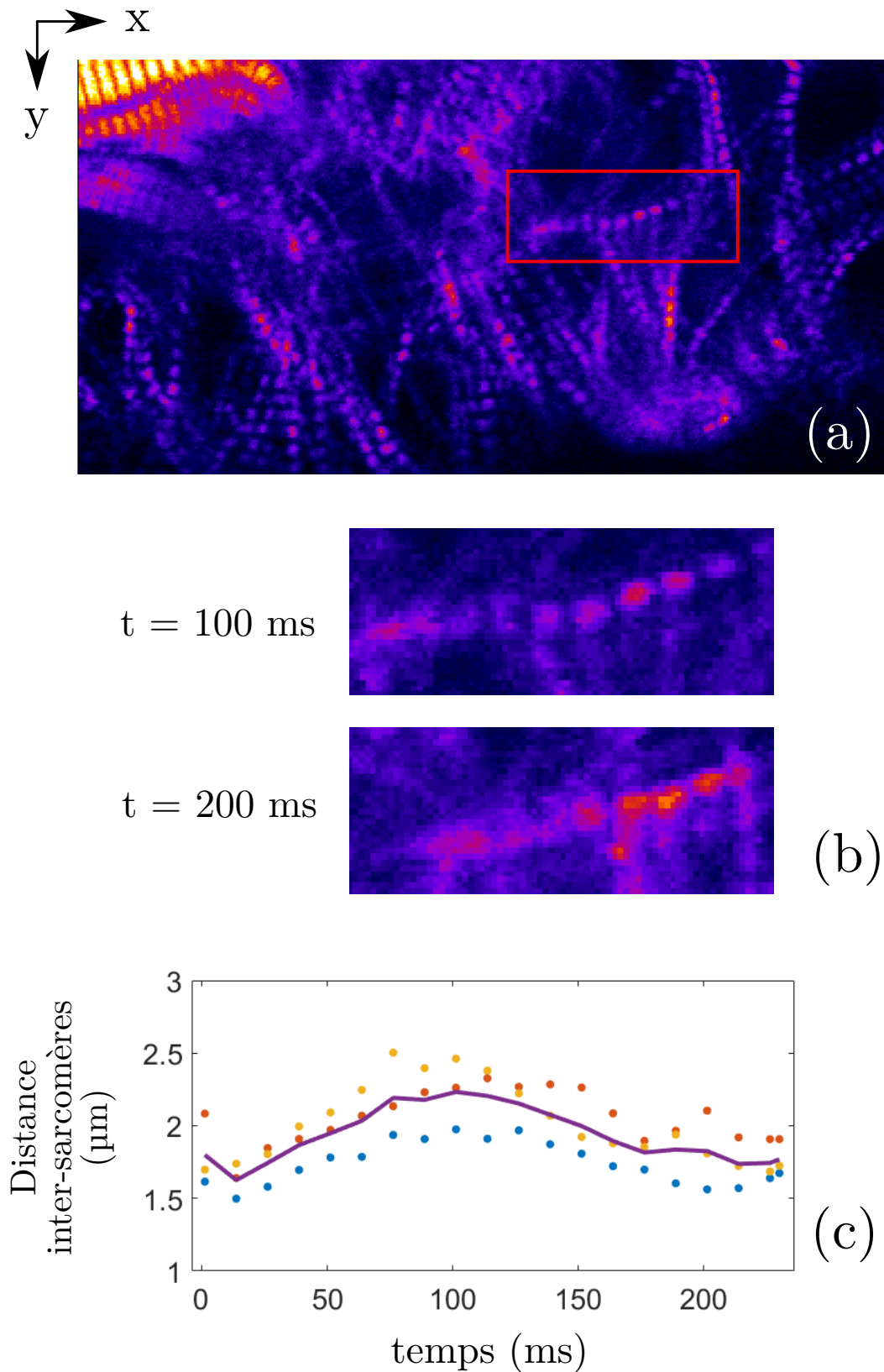


FIGURE 3.52: Quantification dynamique de la distance inter-sarcomère au cours d'un cycle de contraction. (a) est l'image à partir de laquelle s'effectue la quantification, par trois mesures indépendantes de fibres différentes. (b) Image agrandie d'une fibre, relâchée ou partiellement contractée. (c) Quantification de la distance inter-sarcomère de trois fibres différentes au cours du temps. La courbe violette correspond à la moyenne de ces trois mesures.  $\lambda = 1080$  nm ; 800 Hz ; 211x361 px ; période 230 ms ;  $0.29 \mu\text{m}/\text{px}$ .

des similitudes de résultats *in vivo* dans le cœur de souris par exemple [64], ou encore sur cardiomyocytes [65]. Pour rappel, la caractérisation dynamique de sarcomères en SHG avait été par ailleurs uniquement effectuée sur cardiomyocytes [16] ou sur muscles squelettiques *in vivo* [36], par balayage linéaire. Ces techniques ne présentent pas de résolution tridimensionnelle et ne permettent pas d'imagerie en profondeur ; elles requièrent pour la plupart de la chirurgie ou se cantonnent à l'étude des fibres en surface.

En conclusion, nous proposons ici une caractérisation inédite, sans marquage, dynamique et *in vivo* de la taille sarcomères dans le muscle cardiaque. Nous illustrons ici l'intérêt d'imager avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde, sur des images tridimensionnelles. L'aspect volumique est par ailleurs utile au suivi des fibres en profondeur qui peuvent être amenées à se déplacer hors du plan d'imagerie. Dans ces cas, la quantification dynamique demeure possible avec une très bonne précision spatiale et temporelle, ce qui confère une flexibilité importante à la quantification.

**Application à un modèle de myopathie cardiaque** La quantification est donc possible à l'échelle du sarcomère individuel, *in vivo*, et dynamiquement dans le cœur. Afin de mettre en application la technique d'imagerie XTYZ et tirer profit de son potentiel, une voie d'étude concerne les individus dont la contraction cardiaque est perturbée. Être capable d'observer dynamiquement la contraction des fibres individuelles nous renseignerait d'informations essentielles à la compréhension de la biomécanique de la contraction cardiaque dans son ensemble. Dans la suite, nous nous proposons d'étudier un modèle de myopathie cardiaque pour qui la fonction contractile du muscle cardiaque est altérée. C'est notamment le cas des desminopathies, qui regroupent les myopathies dont la cause est l'agrégat de desmin, une protéine essentielle au cytosquelette extra-sarcomérique, résultant en des modifications dégénérative de l'appareil myofibrillaire [66]. De manière pratique, la contraction cardiaque est fonctionnelle mais les individus atteints de la pathologie connaissent à l'âge adulte de graves problèmes cardiaques (arythmies, arrêts cardiaques, etc.)

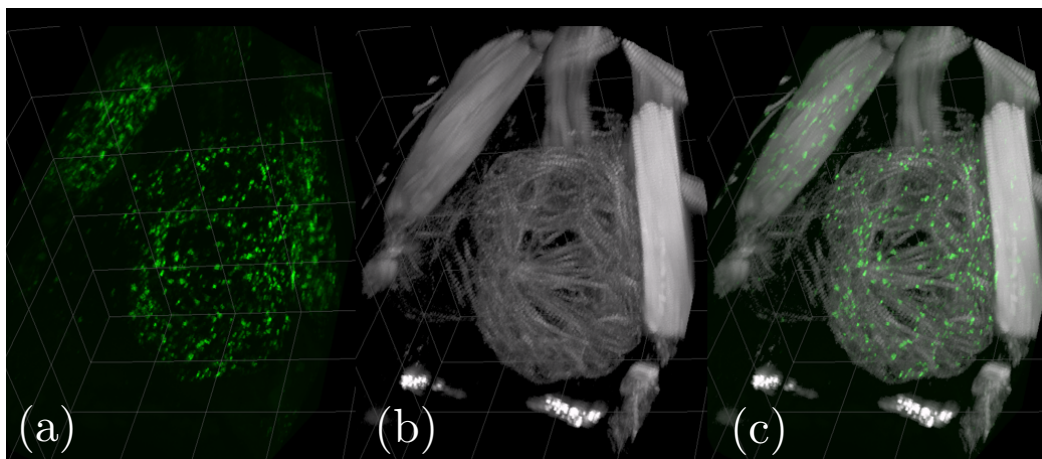


FIGURE 3.53: Imagerie SHG du cœur arrêté de mutant Desmin dynamiquement. (a) Agrégats de desmin (mCitrine). (b) Fibres musculaires (SHG). (c) SHG + fluorescence. Images obtenues par Guy Malkinson.

À partir de l'étude menée par Ramsbacher et. al [67] sur les muscles squelettiques, et de la collaboration avec l'équipe de Julien Vermot à l'IGBMC, nous avons utilisé ici un modèle de poissons-zèbres génétiquement modifiés permettant l'étude de l'influence des agrégats de desmin sur la fonction cardiaque. Ceux-ci sont alors marqués au moyen de deux protéines

fluorescentes selon la lignée : desma mCherry, ou desma Citrine. Dans cet article, les différents embryons présentent des phénotypes malades plus ou moins marqués ; le signal SHG obtenu se détériore drastiquement chez les cas les plus extrêmes, témoignant d'une désorganisation interne de la structure des sarcomères squelettiques. Au LOB cependant, des acquisitions statiques sur cœur arrêté ont été obtenues par Guy Malkinson sur le dispositif TriMScope, et sont présentées figure 3.53. Le canal de fluorescence nous renseigne alors sur la forme des agrégats de desmin (et confirme la desminopathie), quand la SHG nous renseigne sur la structure du myocarde.

Pour avoir un aperçu dynamique de la contraction du muscle malade, nous avons collecté une image de cœur d'un poisson-zèbre desmin citrine par imagerie XTYZ : l'une d'entre elle est exposée figure 3.54. Elle présente le battement d'un coeur desminopathe à 1000 Hz, sur un champ de vue de  $130 \times 162 \times 22.5 \mu\text{m}$ , avec une résolution spatiale du sarcomère individuel même contracté. Nous n'observons ainsi jamais les phénotypes forts ou extrêmes décrits dans [67], pas même sur les muscles squelettiques. Sans avoir procédé à une quantification détaillée des sarcomères au sein de ces acquisitions, la fonction contractile du cœur ne nous a semblé altérée sur aucune image obtenue. En revanche, nous observons ponctuellement et sur quelques fibres, que celle-ci se tordent (phénomène de flambage) à la contraction 3.55. Ce comportement semble se retrouver cependant, mais à moindre mesure, chez le type sauvage, ne nous permettant pas d'affirmer qu'il est à attribuer à la desminopathie.

En conclusion, nous avons ainsi pu obtenir des images tridimensionnelles *in vivo* de la contraction cardiaque à l'échelle du sarcomère, avec une résolution spatiale et temporelle sans précédent. La méthode d'imagerie XTYZ rend possible le suivi dynamique des fibres musculaires cardiaques possible, et ouvre de belles perspectives à l'étude de myopathies, dont les dysfonctionnements de la contraction peuvent être subtils. Nous avons notamment montré que la technique peut servir à observer le comportement *in vivo* d'un modèle de myopathie cardiaque, et potentiellement de caractériser les défauts structurels qui y sont associés.

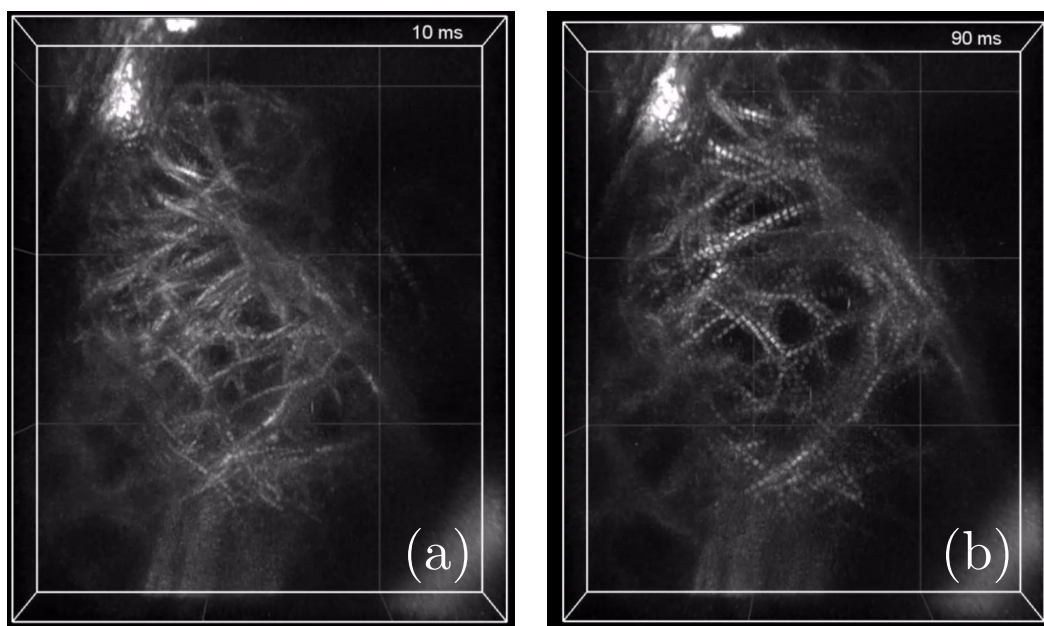


FIGURE 3.54: Imagerie SHG du cœur de mutant Desmin dynamiquement, à 1000 Hz.  $359 \times 317 \times 9$  voxels, soit un champ de vue de  $162 \times 130 \times 22.5 \mu\text{m}$  (équivalent à un taux de pixels par seconde de 1024 MHz). (a) Phase de contraction. (b) Phase de relâchement.  $\lambda = 1090 \text{ nm}$  ; résolutions  $0.41 \times 0.41 \times 2.5 \mu\text{m}/\text{px}$ .

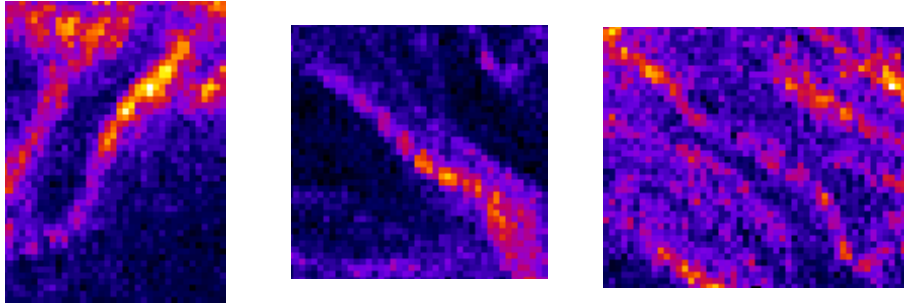


FIGURE 3.55: Phénomène de flambage observé sur certaines fibres du muscle cardiaque chez le Desmin.

### 3.3.6 Imagerie multimodale

La SHG est un mode de contraste sans marquage très spécifique du muscle cardiaque. Cependant, il demeure possible de coupler le signal SHG/THG à d'autres modes de contraste ; la fluorescence, de par sa large sélection de marquages disponibles, offre alors beaucoup de flexibilité dans le choix des structures à révéler et à étudier et ainsi rendre l'analyse biologique plus pertinente.

**Imagerie 5 canaux** L'une des forces de notre montage TriMScope réside dans le nombre de canaux simultanés qu'il est possible d'utiliser pour l'imagerie. Comme présenté dans la section 3.2.2.1, le montage présente deux blocs de détection distincts : un en épi-détection, comportant 3 PMT optimisés pour la fluorescence à des gammes spectrales différentes, et un bloc en transmission optimisé pour la détection des signaux cohérents. Grâce à cette disposition, nous pouvons alors imager de manière synchrone jusqu'à 5 canaux différents, dont un spécifique à la référence. Dans la pratique, cela correspond à 1 canal de référence, 2 pour la fluorescence, et 2 pour les signaux SHG/THG.

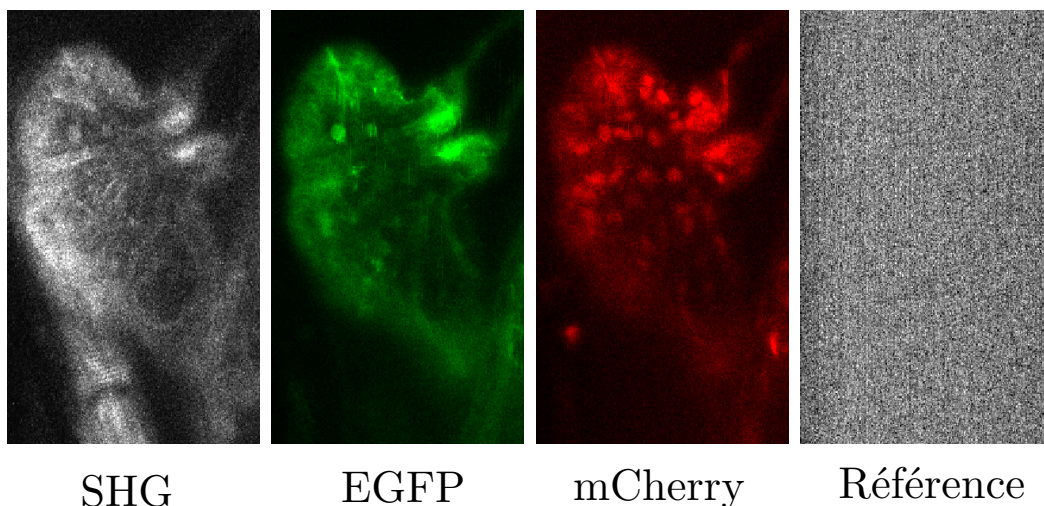


FIGURE 3.56: Acquisition XTYZ du cœur à 4 canaux.

Si la détection permet l'imagerie simultanée de 5 canaux, l'excitation aussi permet théoriquement de générer jusqu'à 5 signaux spécifiques de structures différentes. Comme développé dans la section 3.2.2.1 nous disposons sur le montage de deux lignes laser complémentaires, ajustables en longueur d'onde, ainsi qu'une illumination LED additionnelle implémentée sous

le bloc de transmission utile à la génération du signal de référence. Dans la pratique, une seule longueur d'onde excitatrice peut exciter plusieurs fluorophores en même temps, grâce à l'étalement des spectres d'excitation de ceux-ci. De ce fait, avec deux lignes laser et un traitement astucieux des chemins optiques et des détecteurs, il est possible de générer 4 signaux distincts, spécifiques de structures différentes et indépendantes. Pour illustrer ceci, prenons l'exemple de l'acquisition présentée à la figure 3.56, d'un transgénique marqué pour l'actine en GFP (Tg(fli1ep :Lifeact-EGFP)), et en mCherry pour les noyaux (Tg(kdrl.1 :NLS-mCherry)). L'image obtenue contient 4 canaux différents : 2 de fluorescence (vert spécifique de l'endocarde, et rouge pour le marquage des noyaux en épi), 1 pour la SHG (en trans) et 1 pour la référence (en épi). Pour obtenir une telle image, nous avons alors utilisé les deux lignes laser : le laser MaiTai à 900 nm, ainsi que le laser Insight à 1200 nm. Avec cette configuration, nous avons alors permis de collecter les signaux suivants :

- La GFP (actine) grâce au MaiTai à 900 nm, détecté entre 524 et 554 nm sur le PMT vert. Le spectre d'excitation 2-photon de la GFP s'étend de 850 à 1000 nm, et émet entre 500 et 550 nm.
- La mCherry (noyaux) grâce à l'Insight à 1200 nm, détecté entre 572 et 642 nm sur le PMT rouge. Le spectre d'excitation 2-photon de la mCherry s'étend de 950 à 1200 nm, et émet entre 530 et 600 nm.
- La SHG, grâce à l'Insight à 1200 nm. Le signal SHG sera alors collecté à 600 nm.
- La référence, collectée entre 660 et 690 nm.

Par ailleurs, nous aurions pu ajouter la détection de la THG à 400 nm sur le PMT disponible en épi-détection, et ainsi obtenir une image sur 5 canaux. Cependant, dans le cas d'une illumination par deux voies laser, il est important de considérer le problème des photodommages induits à l'échantillon avec attention. L'obtention d'un signal de THG requérant des puissances crêtes très élevées (phénomène d'ordre 3), nous aurions pu compromettre l'intégrité de l'échantillon pour collecter ce dernier canal. Finalement, en observant les images de la figure 3.56, il semble que certains signaux se retrouvent sur plusieurs canaux différents. Ce phénomène de débordement du signal (*bleed through* en anglais) est dû à une segmentation imparfaite des gammes spectrales à la détection. On remarque en particulier que le signal GFP spécifique de l'actine (qui marque notamment les valves cardiaques), est détecté dans les canaux de SHG et mCherry. Bien que problématique, il est possible d'atténuer ce problème en procédant à un démixage du signal a posteriori, par traitement des images. Cette technique permet par soustraction et normalisation des canaux de ne conserver que le signal spécifique à un canal donné.

Le dispositif que nous utilisons nous permet donc de collecter simultanément les signaux de fluorescence et d'harmonique, et propose ainsi de réaliser des images multimodales combinant jusqu'à quatre types de contrastes. Dans la section suivante, appliqueront cette propriété du dispositif à l'étude des structures les plus dynamiques du coeur : les valves cardiaques.

**Valves cardiaques** Grâce aux marquages par protéines fluorescentes, on peut obtenir un contraste spécifique et très intense de certaines structures. Dans le cadre de l'imagerie XTYZ, un signal fort signifie qu'il n'est pas nécessaire de s'attarder longtemps sur chaque pixel ou d'illuminer fortement l'échantillon pour obtenir un RSB correct ; en d'autres termes, on peut augmenter la vitesse de balayage des lignes et donc directement améliorer la résolution temporelle de nos images. Dans cette section, nous proposons de tirer profit des forts signaux de fluorescence pour pousser les conditions d'imagerie dans le but d'imager le plus vite possible. Nous exploiterons ainsi la technique XTYZ à l'imagerie haute-vitesse des structures les plus dynamiques du coeur en imagerie multimodale : les valves cardiaques.



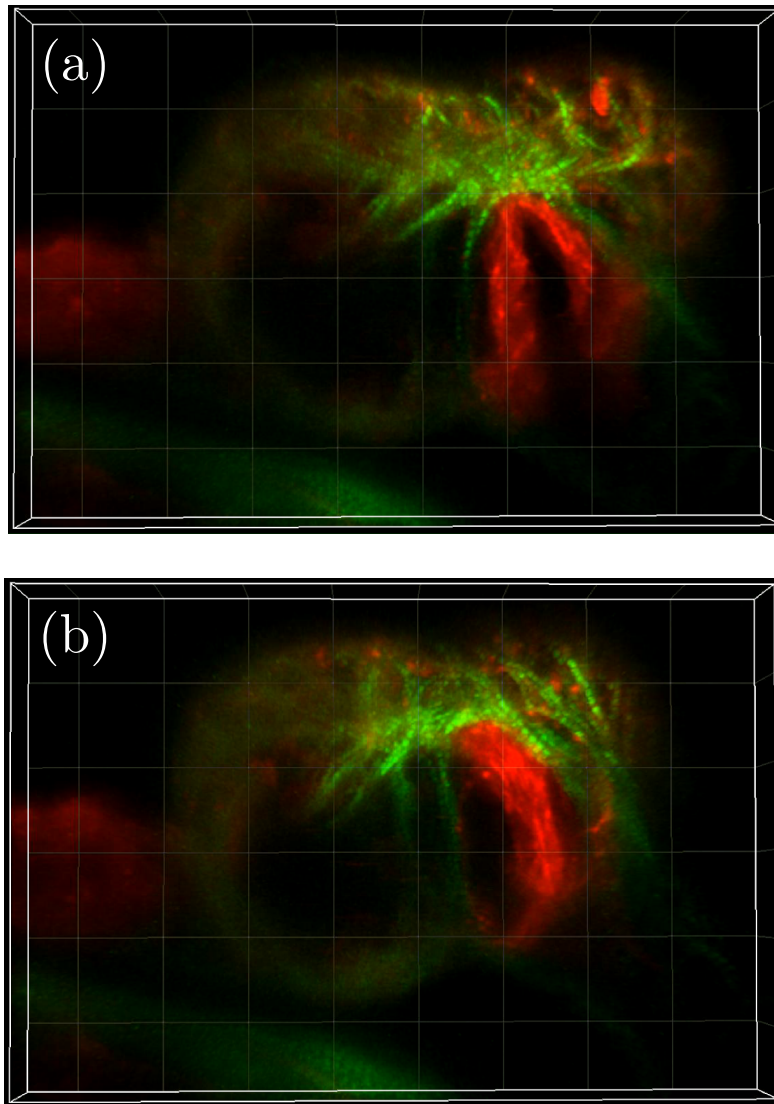


FIGURE 3.57: Image SHG et fluorescence du cœur 3D d'une valve cardiaque, 800 Hz. (a) Valve ouverte. (b) Valve fermée. SHG en vert, marquage lifeact :GFP de l'endocarde en rouge ; 358x242x4 voxels ; résolution de 0.5x0.5x5  $\mu\text{m}/\text{px}$ .

En effet, les valves cardiaques sont de très bons candidats à l'imagerie haute-vitesse : au cours de leur fermeture, elles peuvent atteindre des vitesses de plusieurs millimètres par seconde [29]. Pour résoudre de tels mouvements avec une bonne résolution spatiale, il est nécessaire d'imager à d'excellentes résolutions temporelles pour ne pas être limité par le flou cinétique. Le marquage lifeact-eGFP décrit au paragraphe précédent permet alors de repérer les valves en fluorescence et peut être combinée au signal SHG, à l'exemple de la figure 3.57. Sur cette image, l'acquisition multimodale nous permet observer les fibres musculaires se contracter dynamiquement en SHG simultanément avec la fermeture des valves cardiaque en fluorescence, sur un grand champ de vue (environ 273x121x20  $\mu\text{m}$ ) et en 3D. Un autre exemple, plus rapide encore, est présenté figure 3.58 : on peut y voir une image XTY reconstruite en SHG (rouge) et fluorescence (actine de l'endocarde en GFP en vert) à 1200 Hz. Sur cette image, on distingue clairement les deux valves cardiaques : en haut, la valve séparant les deux cavités du cœur de poisson-zèbre, le ventricule et l'atrium. En bas, la valve d'éjection (*outflow tract* en anglais). La vitesse d'imagerie nous permet de repérer avec précision l'ouverture et la fermeture de ces deux valves respectives. On remarque par ailleurs la présence de lignes (en vert) artefactuelles sur l'image. Celles-ci correspondent à un signal ponctuel de

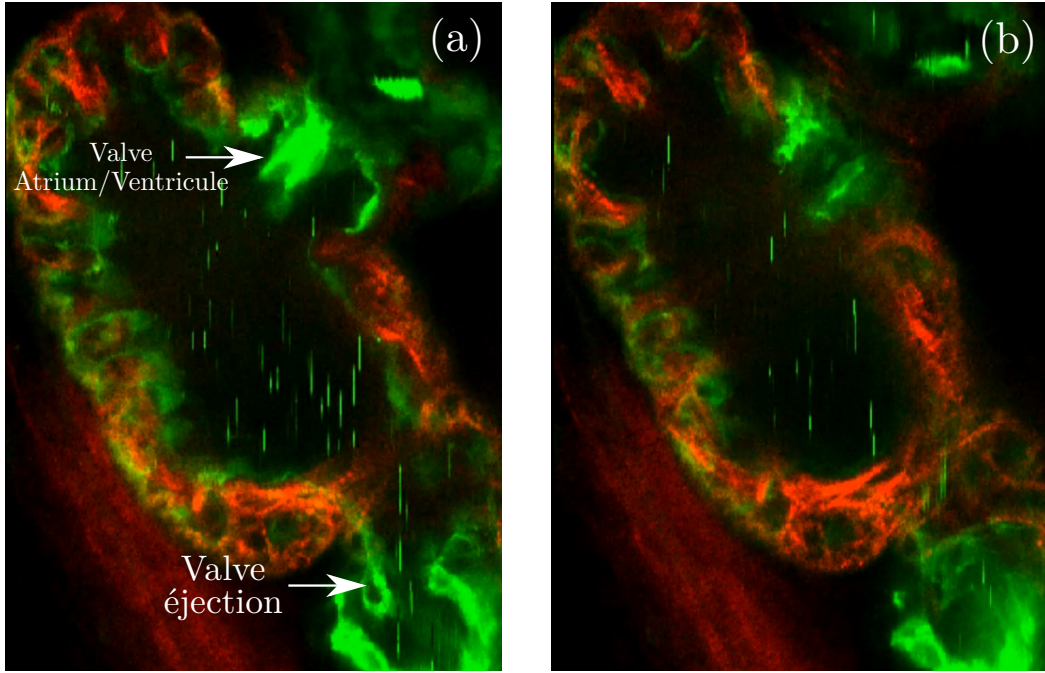


FIGURE 3.58: Image SHG/fluorescence du cœur présentant les deux valves cardiaques, 1200 Hz. En vert le signal de fluorescence de l'endocarde, en rouge la SHG. (a) Valve d'éjection ouverte, valve atrium/ventricule fermée. (b) Valve éjection fermée, valve atrium/ventricule ouverte.

fluorescence provenant de cellules sanguines marquées au sein de la cavité, qui une fois traité par la reconstruction XTY, apparaît sous forme de lignes se déplaçant verticalement. La vitesse de déplacement de ces lignes est caractéristique de la vitesse du flux dans la direction  $x$  au sein de cette chambre, et pourrait être utilisé pour une future quantification. Il est à rappeler que la fréquence de 1200 Hz est la vitesse limite d'imagerie, car elle correspond à la fréquence maximale de balayage des miroirs galvanométriques. Au cours de nos acquisitions, le signal était suffisamment fort pour accéder à des vitesses plus élevées encore.

Les images ainsi acquises nous renseignent également sur la vitesse de fermeture de ces valves. En témoigne la figure 3.59, qui nous permet de quantifier cette valeur grâce à la représentation en kymogramme ( $xt$ ). Sur ces images, la dynamique apparaît visuellement : plus les structures sont rapides, plus la pente suivant l'axe  $t$  est élevée. En sélectionnant la ligne  $y$  correspondant spatialement à la fermeture de la valve, on peut alors en déduire sa vitesse. On a ainsi au (b), 45 pixels dans la direction  $x$ , pour 35 points temporels. L'échantillonnage spatial est de  $0.67 \mu\text{m}$  par pixel, et l'échantillonnage temporel de  $1/1200$  secondes par point temporel, soit  $0.83 \text{ ms}$  par point temporel. Ainsi, on peut établir :

$$v_{\text{valve}} = \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{45 \times 0.67}{35 \times 0.83} \approx 1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1} \quad (3.20)$$

Comme nous l'avons détaillé au chapitre d'introduction, la résolution de tels mouvements nécessite, pour ne pas être limité par le flou cinétique, des vitesses supérieures au kilohertz. Cette quantification permet alors de justifier l'imagerie volumique des valves à 1200 Hz, vitesse limitée non pas par le signal, mais par la fréquence de balayage des miroirs galvanométriques. Le signal de fluorescence nous permet donc d'obtenir des images pour lesquelles la vitesse d'imagerie est poussée vers ses limites, tout en conservant une bonne qualité d'image. Il peut être par ailleurs couplé aux signaux d'harmonique et propose ainsi des contrastes différents et complémentaires au signal SHG notamment. Dans l'exemple des valves cardiaque, l'imagerie multimodale nous permet d'observer la structure ainsi que la dynamique de contraction des

valves cardiaques avec une précision temporelle et spatiale inédite.

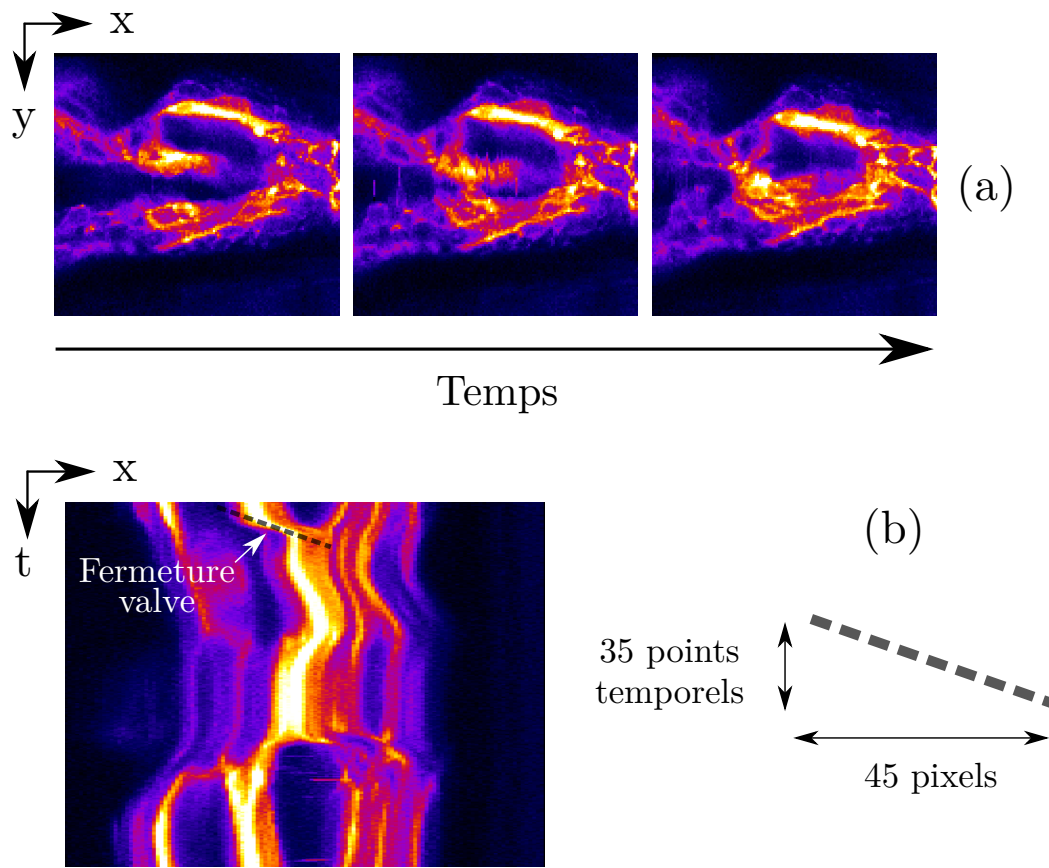


FIGURE 3.59: Caractérisation de la vitesse de fermeture des valves cardiaques en fluorescence, 1200 Hz. (a) Fermeture de la valve d'éjection à 1200 Hz. (b) Grâce au kymogramme, on peut repérer la vitesse maximale de fermeture des valves comme étant la structure de pente la plus forte. À partir de ces données, on peut estimer la vitesse maximale de fermeture des valves.  $\lambda = 900 \text{ nm}$  ; 1200 Hz ; résolution  $0.67 \mu\text{m}/\text{px}$  ;  $125 \times 137 \text{ px}$  ; arl13b GFP ; période 238 ms.

### 3.3.7 Imagerie d'un autre modèle : l'embryon de poulet

Tous les résultats décrits précédemment dans ce chapitre ont été conduits sur l'embryon de poisson-zèbre. Cet organisme présente un nombre très important de transgènes et de mutants, rendant son étude pratique pour de nombreuses questions biologiques. Dans cette section, nous souhaitons démontrer que la méthode d'imagerie XTYZ peut tout à fait s'appliquer à d'autres systèmes modèles et n'est pas spécifique au poisson-zèbre en particulier. Pour ce faire, nous tenterons de reproduire ces acquisitions sur un modèle différent : l'embryon de poulet. Cet organisme est tout à fait pertinent à l'application de notre approche, puisqu'il présente peu de transgènes fluorescents disponibles. Ainsi, le contraste SHG dans le muscle s'avère d'autant plus intéressant qu'il est l'un des seuls moyens de révéler les structures cardiaques à l'imagerie, pour ce modèle. Pour cette application, nous avons collaboré avec Karine Guevorkian de l'Institut Curie, qui utilise l'embryon de poulet pour ses propres travaux. À l'aide de son expertise, en particulier pour le montage et le déroulement général du développement du poulet, nous avons pu en réaliser des images SHG statiques et dynamiques du cœur au stade précoce.

**Les spécificités du poulet comme organisme modèle** Il est alors nécessaire de prendre en compte les spécificités du poulet afin d'en optimiser l'imagerie. La première différence avec

le poisson-zèbre concerne les dimensions temporelles et spatiales, non seulement de l'embryon, mais aussi du cœur. Dans la suite, nous considérerons les embryons à des stades compris entre le stade 12 et 20 somites, correspondant à approximativement à temps de développement compris entre 40 et 50 heures. L'embryon se développe dans un œuf à coquille rigide. À l'intérieur de celui-ci, le vitellus (jaune d'œuf) permet l'apport lipidique à l'embryon, tandis que le blanc le protège mécaniquement des chocs. L'embryon est quant à lui plat, posé en surface du vitellus. Sa forme aplatie permet de distinguer dans le plan les prémices du futur système vasculaire dont le réseau converge vers le cœur. L'embryon sur toute sa longueur mesure quelques millimètres, comme on peut l'estimer à la figure 3.60.

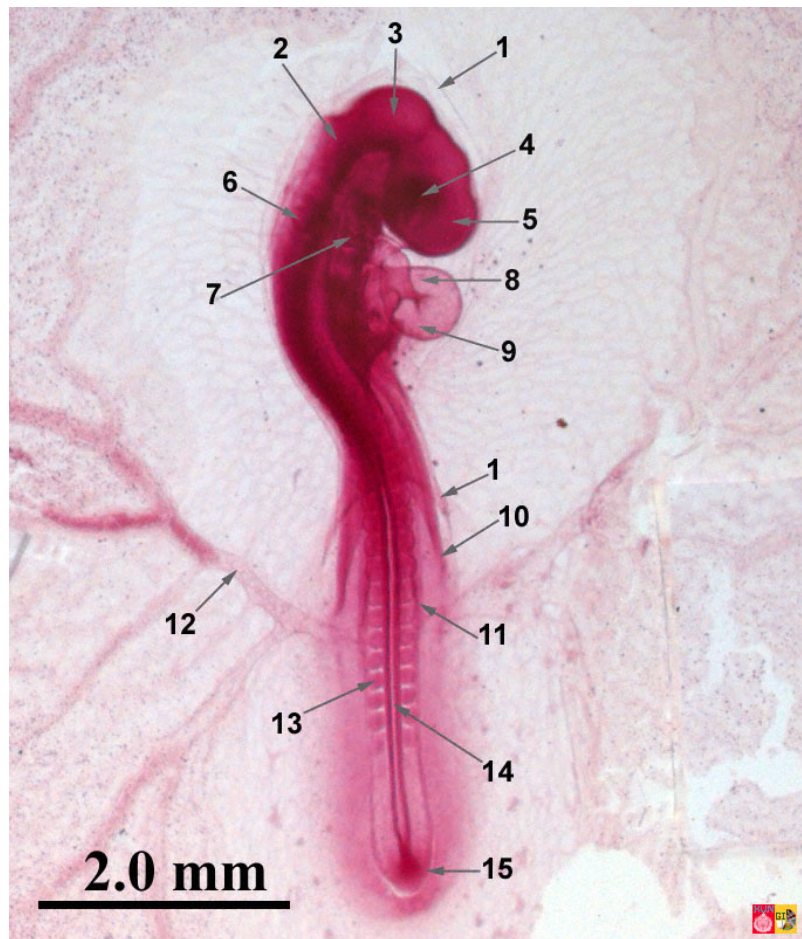


FIGURE 3.60: Embryon de poulet à 48h de développement en lumière blanche. 1 Amnios, 2 Métenéphale, 3 Mésencéphale, 4 Cupule optique + lentille, 5 Prosencéphale, 6 Vésicule otique, 7 Arcs branchiaux, 8 Atrium, 9 Ventricule, 10 Pli latéral, 11 Mésoderme latéral, 12 Artère/veine vitelline, 13 Somite, 14 Épine dorsale, 15 Pli arrière. Tiré du site de Radboud University Nijmegen.

Le cœur de cet embryon est de forme atypique. Aux stades précoces, il est un tube linéaire qui se détache finalement du corps de l'embryon pour former un tube en forme de U, aux alentours du stade 10 somites (33 heures d'incubation) [68; 69]. Sur toute son étendue, le cœur est d'environ 1 millimètre et possède l'avantage d'être très éloigné du reste de l'organisme (8,9 de la figure 3.60), rendant son observation par microscopie d'autant plus aisée. Le faisceau laser ne traverse alors que le tissu cardiaque et n'est pas altéré par d'autres tissus biologiques. Il bat par ailleurs beaucoup plus lentement que chez le poisson-zèbre. Le rythme cardiaque est ici très dépendant de la température ambiante : idéalement conservé à 38°C, le cœur s'arrête rapidement lorsqu'on descend en dessous 20°C mais repart sitôt que la température remonte. Ainsi, la fréquence typique de battement est entre 0.2 et 3 Hz,

dépendamment de la température (la fréquence augmente quand température augmente [70]).

Le cœur de l'embryon de poulet est alors plus volumineux et bat plus lentement que le cœur de poisson-zèbre. Ces deux facteurs rendent son imagerie plus difficile, pour deux raisons. D'abord, sa taille plus importante implique que la contraction cardiaque induit un mouvement plus important des tissus dans l'espace : les mouvements les plus rapides du cœur de poulet sont alors bien plus rapides que ceux du cœur de poisson-zèbre et il devient alors difficile de suivre certaines fibres tout au long du cycle de contraction. Cela impose par ailleurs l'utilisation de champs de vue plus larges, afin de suivre le tissu cardiaque lors de la contraction. Ensuite, le cœur bat plus lentement. La contraction connaît essentiellement deux phases : une phase de contraction où les tissus se déplacent de très rapidement, et une phase de relâchement lente, presque statique. Du point de vue l'imagerie, la reconstruction exige d'imager chaque ligne pendant au moins un cycle : on doit alors passer quelques secondes sur chaque ligne, tout en balayant très fréquemment : ceci se fait alors au détriment du temps total d'acquisition et du RSB de l'image reconstruite. À l'inverse, le signal de référence semble être modulé de manière plus robuste par la contraction cardiaque. Cette propriété est très intéressante, et permettrait alors la reconstruction XTYZ des jeux de données en dépit de la taille et de la vitesse de battement du cœur de ce modèle.

**Montage** Les œufs de poulets fécondés ont été obtenus d'un fournisseur commercial (Earl Morizeau, Dangers, France) et leur incubation s'est faite dans un incubateur humidifié à 37°C. Les expériences décrites dans la suite ont été conduites sur des embryons à des stades allant de 11 à 13 selon la classification de Hamburger-Hamilton (HH) [71], ce qui correspond aux stades où 13-18 somites sont formés. Les embryons ont ensuite été montés sur des supports en papier filtre [72] et transférés sur des lamelles recouvertes d'une couche de gel bacto-agar à 0,6% (Difco Bacto Agar 214010), la face ventrale vers le haut. Les embryons ont été recouverts de quelques gouttes de solution saline tampon de phosphate (PBS, sans  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$ ) pour maintenir l'humidité de l'échantillon. Dans ces conditions, les embryons ont continué de se développer pendant plusieurs heures, c'est-à-dire pendant bien plus longtemps temps typique d'acquisition (<1h). Afin de permettre l'imagerie statique du cœur à haute résolution, celui-ci a été arrêté au moyen d'une solution de 20  $\mu\text{M}$  de vérapamil, dilué dans du PBS. Sous l'effet de la substance, le cœur s'arrête dans les 5 minutes qui suivent son dépôt.

## Résultats

**Imagerie statique** Dans un premier temps, il nous était important de comprendre la structure tridimensionnelle du cœur ; en particulier se repérer dans sa forme caractéristique en U. Pour cela, nous avons alors choisi d'acquérir d'abord des images du cœur statique, préalablement arrêté à l'aide de vérapamil [73]. Cette substance découple l'excitation de la contraction cardiaque et permet l'arrêt du cœur en quelques minutes seulement. L'enjeu est ici de réaliser une image du cœur entier en SHG, donc la taille typique est de l'ordre du millimètre dans les trois directions de l'espace. Le microscope utilisé (TriMScope) ne permet cependant d'acquérir que des champs de vue avoisinant les 500  $\mu\text{m}$ , nous procédons à une acquisition de type mosaïque afin de couvrir toute l'étendue du cœur. Le résultat de l'acquisition correspond à l'image (a) de la figure 3.61.

Grâce à cette acquisition 3D, on peut nettement repérer la forme en U du tube cardiaque. Il est à noter que la structure du cœur semble différente d'un endroit à l'autre : certaines portions, telles que représentées à l'image (b), présentent des fibres enchevêtrées qui semblent désorganisées. À l'inverse, on trouve également des régions où les fibres sont très bien alignées et orientées suivant la même direction. Les quantifications préliminaires de longueur de sar-

comères montrent que leur longueur moyenne dans le cœur de poulet est de l'ordre grandeur typique d'environ 2  $\mu\text{m}$ .

**Imagerie dynamique** Nous avons par ailleurs tenté d'acquérir une image dynamique du cœur battant. À la vue des contraintes imposées par la taille et la vitesse de battement du cœur de poulet, l'objectif était avant tout de parvenir à reconstruire un plan dynamique (xyt), par la méthode de reconstruction XTY détaillée dans ce chapitre. Dans le cas dynamique, le cœur se déplace beaucoup dans la direction z, du fait de sa taille. Ainsi, il peut être difficile de suivre une fibre musculaire durant toute la durée du cycle de contraction : celle-ci, même si initialement dans le plan, peut se déplacer de plusieurs dizaines de microns en suivant le mouvement général des parois du cœur. Ce déplacement en z a également pour effet de créer artificiellement des mouvements très rapides à l'image, correspondant aux structures entrant et sortant du plan d'imagerie.

Malgré cela, nous sommes parvenus à reconstruire des acquisitions dynamiques à 1000 Hz, dont les résultats sont illustrés figure 3.62. L'image (a) représente le kymogramme associé à l'acquisition du cœur. On observe que le signal est de très bonne qualité et le contraste fort : la reconstruction par référence est alors d'ores et déjà précise, et les performances globales de reconstruction bien meilleures. Un exemple est donné au (b) d'un jeu de données reconstruit de la surface du cœur, sur un champ de vue de 245x140  $\mu\text{m}$  et à une fréquence de 1000 Hz. L'échantillonnage spatial est de 0.40  $\mu\text{m}/\text{px}$ ; couplé à la résolution spatiale sous-micrométrique, ces paramètres nous permettent de distinguer dynamiquement les sarcomères individuels.

Pour conclure, nous avons démontré que la méthode d'imagerie XTYZ n'était pas exclusive à un unique organisme modèle. Mieux encore, elle permet l'observation haute-vitesse du cœur battant d'un organisme qu'il est difficile de visualiser par les techniques de fluorescence, en raison de la faible disponibilité des lignées transgéniques chez le poulet. Les images obtenues sont prometteuses et le suivi dynamique des fibres musculaire pourrait être obtenu au moyen d'acquisitions dynamiques en 3D.

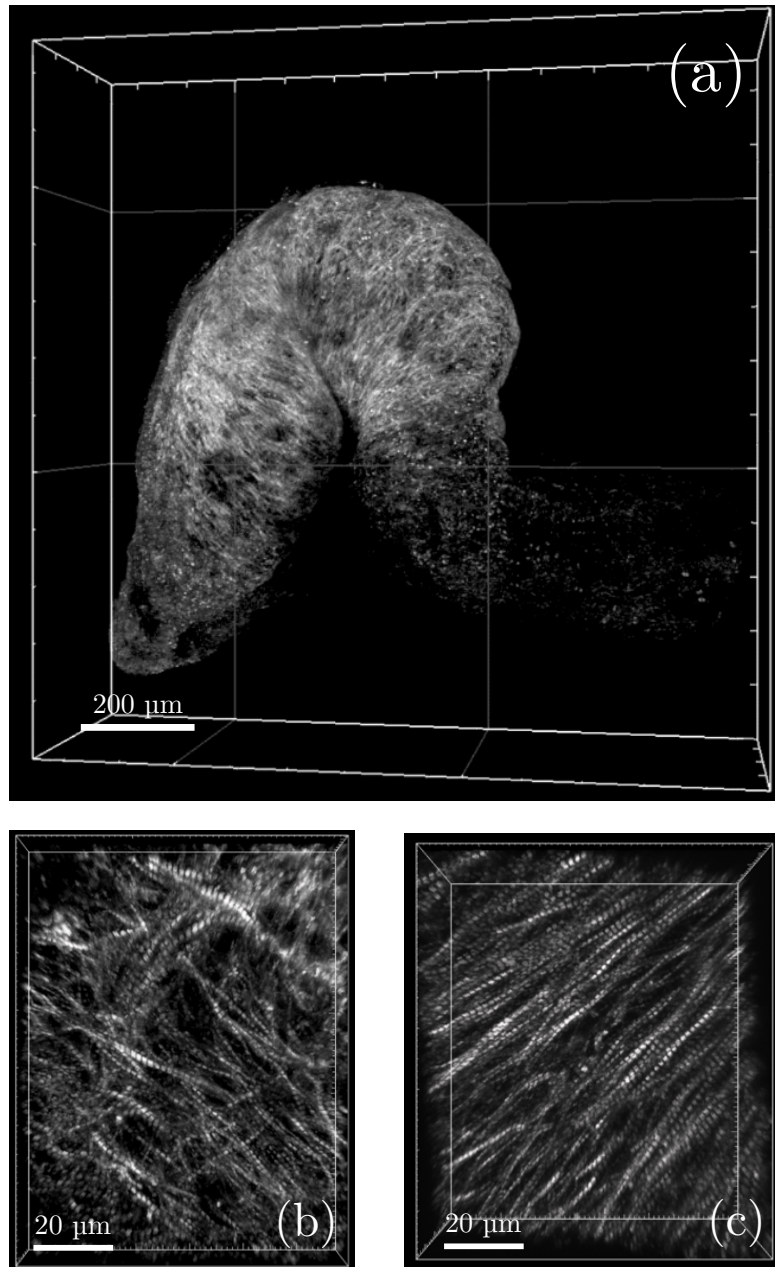


FIGURE 3.61: Acquisitions statiques du cœur arrêté de poulet, stade 16-18 somites. (a) Mosaïque 3x3 du cœur entier en SHG. (b) Structure de fibres enchevêtrées dans le cœur. (c) Structure de fibres alignées dans le cœur.  $1.2 \mu\text{m}/\text{px}$ ;  $1255 \times 1255 \times 380 \mu\text{m}^3$ ;  $\lambda = 1090 \text{ nm}$ ; mosaïque 6 tuiles.

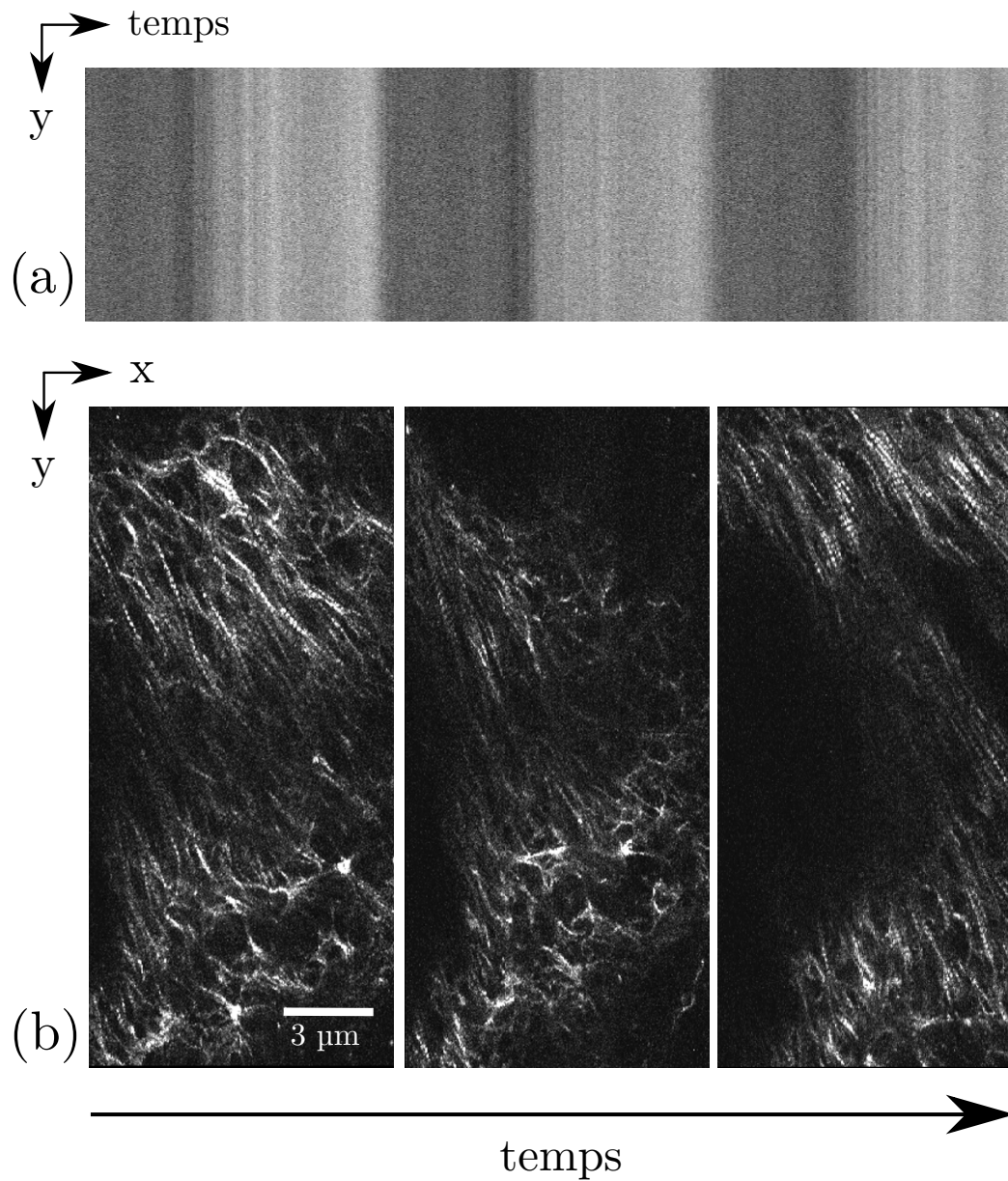


FIGURE 3.62: Acquisitions dynamiques du cœur poulet. (a) Kymogramme de la référence associée à l'acquisition. Le cœur de poulet permet d'obtenir un signal de référence très contrasté, permettant une reconstruction très précise dès l'étape de reconstruction par référence. (b) Images SHG tirées d'une acquisition dynamique à 1000 Hz du cœur de poulet au stade 20 somites. 245x110  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{s}$  par pixel, échantillonnage à 0.40  $\mu\text{m}$  par pixel;  $\lambda = 1090 \text{ nm}$ ; 1000 Hz.



## 3.4 Perspectives

Au cours de la section précédente, nous avons discuté les quantifications de la méthode, que nous avons par ailleurs illustrées au moyen d'applications biologiques. Toutefois, le développement de la méthode XTYZ fait encore l'objet d'améliorations ; les sujets d'applications sont nombreux et les perspectives très prometteuses. Cette section propose de détailler les directions que peut emprunter la suite du projet, associées pour la plupart à des études préliminaires de chacun de ces aspects.

### 3.4.1 Amélioration de la reconstruction XTYZ

Cette section vise à exposer les éventuelles perspectives d'amélioration de la reconstruction XTYZ dans son ensemble. D'un côté, cela correspond à l'amélioration logicielle de l'algorithme, comme par exemple l'ajout de nouvelles fonctionnalités. De l'autre, il s'agit également d'optimiser en amont le montage expérimental afin de faciliter les reconstructions par la suite. Le constat est alors que l'algorithme de reconstruction est aujourd'hui fonctionnel, performant, et permet la reconstruction de la plupart des jeux de données. Cependant, il existe de nombreux points d'amélioration des fonctionnalités déjà implémentées, de même que de perspectives de développement de nouvelles méthodes.

Parmi les limitations logicielles, on peut avancer que la reconstruction d'une image tridimensionnelle peut être relativement longue : jusqu'à plusieurs heures de calcul pour un jeu de données volumineux. Dans le cas général, reconstruire une image dure quelques dizaines de minutes. Bien que ceci ne soit pas un véritable problème, l'amélioration du problème de complexité est certainement possible et permettrait de faciliter l'usage de cette méthode de reconstruction. L'objectif de cette section n'est cependant pas de discuter d'éventuels points d'améliorations de certains aspects déjà existants de la routine, mais plutôt d'exposer les idées de perspectives à implémenter dans le futur. Nous détaillerons ici deux exemples : le découplage des signaux périodiques, stationnaires et apériodiques, ainsi que la correction des arythmies par estimation non-linéaire de la phase. Par la suite, nous proposerons également une idée d'amélioration du signal de référence qui permettra des reconstructions plus *précises* dès l'étape de synchronisation par la référence.

**Découplage des signaux périodiques, stationnaires, apériodiques** Sur la figure 3.58 illustrant l'application à l'étude des valves, on remarque la présence de lignes verticales artefactuelles sur l'image. Si celles-ci sont d'apparence inesthétique, ce signal nous renseigne pourtant sur la vitesse du flux sanguin à l'intérieur du ventricule. À partir de cet exemple, se fait sentir le besoin de filtrer les signaux non-périodiques, correspondant ici aux cellules sanguines marquées. En effet, et comme énoncé dans la section précédente, l'objectif de la reconstruction est d'isoler le mouvement typique d'un cycle cardiaque. Cependant, nous souhaitons également conserver l'information d'apériodicité, pour notamment la quantifier. On peut alors classer les signaux en trois catégories distinctes : le signal périodique, les signaux stationnaires, et les signaux apériodiques (ponctuels ceux-ci). Par un traitement astucieux des images, il est en effet possible de dissocier ces types de signaux dans trois canaux distincts afin d'extraire l'information qu'ils contiennent.

L'étape de repliement permet alors de reconstituer une image typique du cœur. Ainsi, le kymogramme replié de chaque ligne est une version moyennée, représentant le kymogramme typique ( $xt$ ), comportant uniquement le signal périodique. En comparant celui-ci au kymogramme brut, il est alors possible d'identifier les singularités associées aux phénomènes apériodiques et donc de les extraire. Grâce à l'étape de repliement à nouveau, le signal stationnaire peut également être isolé. Lors de cette étape, le signal stationnaire sera nécessairement

bien replié quelle que soit la période candidate utilisée. Ce critère peut alors être utilisé pour extraire ce signal dans un troisième canal.

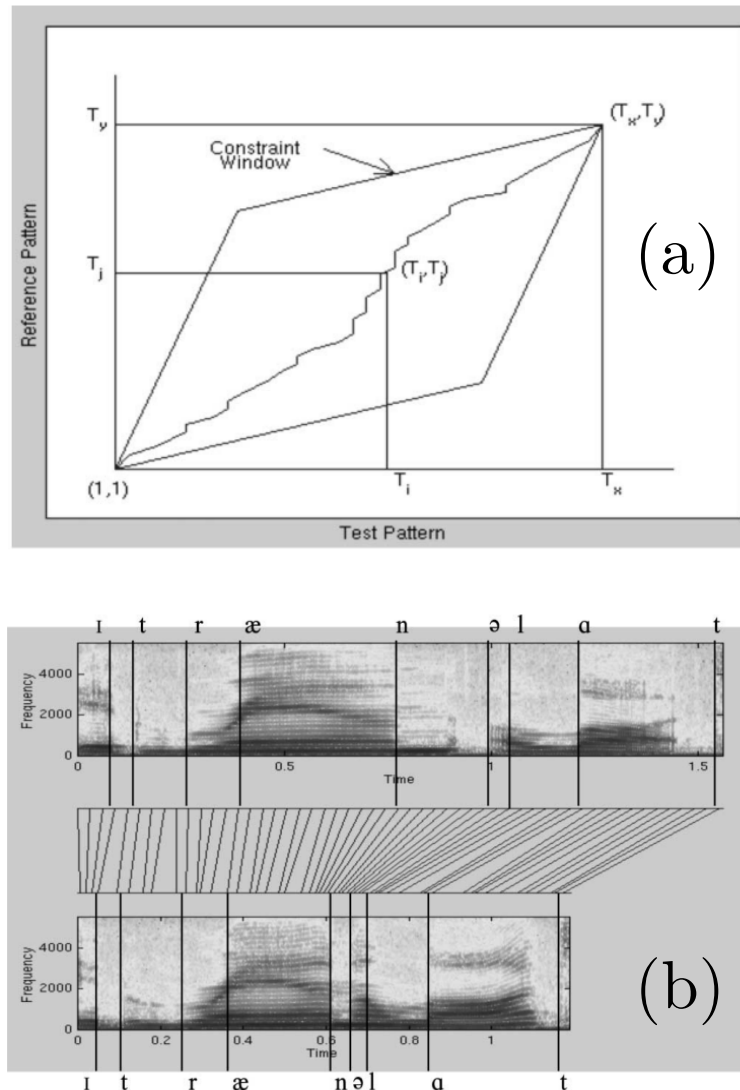


FIGURE 3.63: Exemple de déformation temporelle utile à la gestion des arythmies non-linéaires. (a) Fonction de déformation temporelle non-linéaire. La fonction définit alors un chemin temporel non-linéaire, qui vise à corriger les non-linéarités temporelles du cycle de contraction. (b) Application de cette fonction à la déformation d'un spectrogramme (signal vocal temps-fréquence). Tiré de [74].

**Estimation non-linéaire de la phase** La section 3.3.3 exposait le problème de la gestion des arythmies par l'algorithme de reconstruction, en particulier lors des apériodicités intralignes. Nous avons ainsi conclu que par une sélection astucieuse des périodes se repliant le mieux, il était possible de s'affranchir de la plupart des problèmes liés aux apériodicités intralignes. Cette solution naïve ne permet cependant pas de se parer de tout type d'arythmies. Une perspective d'amélioration, qui aurait alors une résonance importante sur la qualité des repliements et donc de l'image reconstruite, serait de permettre l'estimation de la non-linéarité temporelle de ces arythmies pour ensuite les corriger. Liebling et al. [75] ont déjà utilisé une approche similaire pour les reconstruction XYTZ. La méthode consiste à définir une fonction de déformation temporelle (*warping function* en anglais) non-linéaire, telle qu'elle corrige la non-linéarité temporelle de l'arythmie (figure 3.63). Grâce à cette technique, on peut déformer non-linéairement le signal temporel (par exemple la dimension  $t$  du kymogramme), afin de

maximiser la correspondance d'une ligne à l'autre. Cette méthode est alors une version plus avancée de la déformation rigide que nous appliquons à ce jour, puisqu'elle prend en compte le caractère non-linéaire de la contraction dans le temps.

Il est cependant à noter que cette correction permet de traiter les apériodicités non-linéaires temporelles uniquement. La méthode n'est d'aucun recours pour les apériodicités spatiales, dont le signal sur le kymogramme ne peut-être être corrigé de la sorte. Grâce à cette implémentation, nous pourrions améliorer la qualité de la synchronisation en tout point du cycle. Cette modification va alors dans le sens de la reconstruction d'un cycle typique du coeur, atténuant là encore les arythmies et apériodicités inhérentes au battement cardiaque. Cependant, elle nous permet également de les quantifier : c'est un moyen d'estimer la progression de la phase au cours du temps et par extension les apériodicités temporelles du battement.

**Amélioration de la référence** Comme nous l'avons discuté dans la section des résultats, l'algorithme de reconstruction ainsi implémenté est *exact*, grâce à la référence, et *précis* grâce à la surcouche de maximisation de correspondance. Cependant, la référence seule pourrait elle-même présenter ces deux caractéristiques, si seulement le signal modulé par le coeur présentait un meilleur contraste. Il est donc très important de tenter d'améliorer le signal de référence, celui-ci permettant une reconstruction plus robuste et de meilleure qualité générale.

**Limitations du signal de référence** Dans la pratique, le signal de référence est largement sujet au bruit de Poisson, qui détériore son contraste et par extension la qualité de la reconstruction. En pratique, la modulation que nous obtenons est faible, c'est-à-dire de l'ordre de quelques pourcents : pour un signal moyen d'environ 10000 comptes sur le logiciel Inspector, nous observons une modulation crête à crête de 100 à 200 comptes (la correspondance comptes/photons est détaillée au paragraphe Gain des PMT, section 3.2.3.1). En effet, la plupart des rayons incidents qui traversent le coeur ne sont que faiblement déviés : la majeure partie d'entre eux est collectée par l'objectif et ce quelque-soit la phase de contraction.

La faible modulation (ou le fort niveau de signal moyen) n'est pas un problème en vue de la reconstruction par référence, puisque les algorithmes utilisés par la suite ne sont pas sensibles à la valeur moyenne du signal mais au Rapport Contraste sur Bruit (RCB ou *CNR* en anglais). En revanche, même si cette valeur moyenne du signal n'a pas d'influence directe sur la qualité de l'estimation du déphasage, elle est responsable d'un autre phénomène, problématique celui-ci : l'ajout d'un **bruit de Schottky** (bruit de grenaille ou *Shot Noise*) s'ajoutant à la modulation. Le bruit de Schottky repose sur la nature corpusculaire de la lumière : lorsque collectés par un détecteur pendant une durée  $\Delta t$ , le nombre de photons collectés  $N$  va varier selon une loi de Poisson, approximée par une loi Gaussienne pour un grand nombre de photons. Selon cette distribution, l'écart-type associé est alors  $\sqrt{N}$ . Considérant le contraste linéairement dépendant de  $N$ , on peut alors écrire que le CNR est le rapport de ces deux grandeurs :

$$CNR = \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N} \quad (3.21)$$

De ceci, il apparaît que pour améliorer la modulation, il faut augmenter le signal incident. Cependant, nous sommes ici limités par la dynamique des PMT : ceux-ci saturent rapidement et pour des illuminations faibles et ne permettent d'augmenter le flux de photons que modérément.

**Illumination en champ sombre** L'implémentation actuelle de la référence repose sur la déviation des faisceaux lumineux incident par le coeur, modulant ainsi la quantité de lumière

parvenant à l'objectif et donc au détecteur. Avec le schéma de la figure 3.23, on comprend que la plupart de la lumière incidente pénètre toujours dans l'objectif et ne contribue pas à la modulation : en majorité, ce sont les rayons extrémaux qui risquent d'être déviés hors de l'ouverture de l'objectif. C'est ce que l'on observe en pratique sur le signal de référence : la fluctuation pic-vallée correspond à quelques pourcents du nombre de comptes total. Toutefois, le bruit de poisson étant dépendant du nombre de photons parvenant au détecteur, cette approche tend à maximiser les fluctuations de signal et ainsi à diminuer le contraste.

Pour répondre à cette problématique, nous avons imaginé implémenter une illumination en champ sombre (*dark field* en anglais), dont le principe est présenté figure 3.64. Cette méthode propose de couper, au moyen d'un diaphragme dans le plan focal du condenseur, les rayons faiblement inclinés au niveau de l'échantillon. En ne conservant que les rayons à fort angle d'incidence on permet alors de créer une image sur fond noir, où la composante continue a été spatialement filtrée. Le contraste est alors obtenu par la déviation des faisceaux extrémaux par réfraction sur l'échantillon. L'intensité générale du signal est plus faible qu'en champ clair, mais le contraste est meilleur.

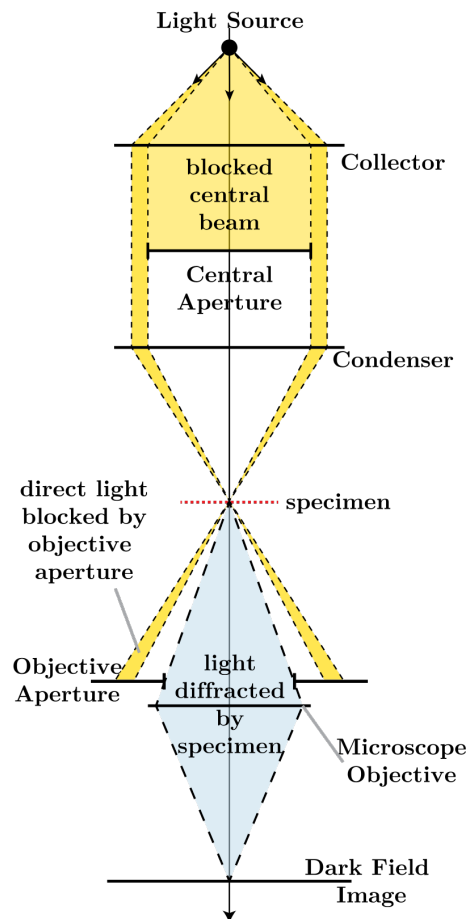


FIGURE 3.64: Principe de l'illumination en champ sombre. Le principe consiste à bloquer les vecteurs d'ondes faibles, correspondant aux rayons faiblement inclinés. On ne conserve alors que les rayons fortement inclinés, qui peuvent être déviés par réfraction sur l'échantillon.

Avec cette méthode, on peut espérer améliorer le contraste du signal de référence, en s'affranchissant de la forte contribution du bruit de photon. C'est une amélioration qui pourrait améliorer de manière drastique la qualité de reconstruction dès l'étape de synchronisation par référence : un signal de référence à fort contraste permet une reconstruction beaucoup plus

précise.

### 3.4.2 Imagerie SHG du cœur

La méthode XTYZ permet l'imagerie rapide des structures cardiaque par contraste SHG et ainsi de porter un nouveau regard, dynamique cette fois, à l'étude du cœur *in vivo*. Comme souligné dans la section introductive, les tentatives d'études du muscle cardiaque se sont toujours confrontées aux limitations techniques de l'imagerie dynamique et se sont essentiellement cantonnés aux études statiques. En revanche, les études sur les muscles squelettiques sont plus nombreuses ; ceci est dû au fait que les limitations techniques sont plus souples. D'abord, le signal y est plus fort, les muscles plus accessibles et plus pratique à imager dans des conditions physiologiques. Tous ces facteurs ont alors permis de faciliter l'étude dynamique des muscles squelettiques, et donc de multiplier les méthodes et techniques d'analyses. L'apport dynamique de la méthode XTYZ est alors prometteur à l'étude du muscle cardiaque : il suffit alors de transposer les différents analyses et techniques des muscles squelettiques au cœur.

**Implémentation de techniques connexes** Parmi les études approfondies que l'on peut conduire, on peut citer par exemple l'analyse en polarisation de la SHG dans les muscles squelettiques du lapin, par Nucciotti et al. [76]. En combinant les approches polarimétriques à la méthode XTYZ, il serait possible d'obtenir d'avantage d'informations structurales à très haute vitesse, sur le cœur *in vivo*. Comme illustré figure 3.65, l'intensité du signal SHG dans les muscles est sensible à la direction de la polarisation incidente.

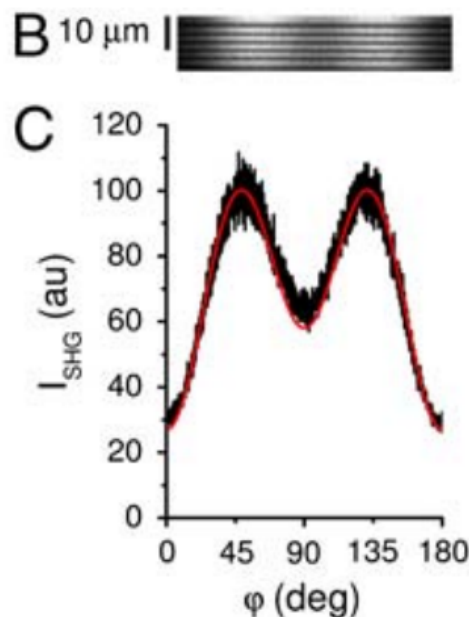


FIGURE 3.65: Effet de l'orientation de polarisation sur le signal SHG des sarcomères. (B) correspond à un balayage linéaire répété 1000 fois, synchronisé avec une rotation de la polarisation incidente. (C) décrit la courbe d'intensité en fonction de ces 1000 balayages.

Dans la pratique, il s'agirait de modifier la polarisation incidente à chaque balayage de ligne et de procéder à des acquisitions de type **XTPYZ**. De la sorte, nous serions en mesure d'estimer, grâce au signal SHG résolu en polarisation, la conformation de la myosine et donc de l'état du sarcomère (relâché, contracté) au cours du temps. L'implémentation de cette méthode semble alors assez directe, puisqu'il suffirait d'introduire la modification de

la polarisation à l'acquisition déjà existante pour permettre ce type d'imagerie. Le signal de référence et celui de fluorescence (approche multimodale) sont alors de bons candidats à la reconstruction de l'image (le signal SHG variant avec la polarisation).

Par ailleurs, il est également envisageable de combiner notre approche XTYZ avec les techniques FLIM et FRET, dont la détection est déjà implémentée sur le montage TriMScope. En couplant les techniques, il pourrait être possible d'associer le contraste et les caractérisations des interactions moléculaires et de métabolisme par FLIM-FRET, à la vitesse d'imagerie des acquisitions XTYZ.

**Cœur adulte** La méthode XTYZ a jusqu'à présent été exclusivement appliquée à l'étude du cœur embryonnaire chez le poisson-zèbre et le poulet. Cependant, de par nos collaborations notamment avec le groupe de Nadia Mercader à l'Institut d'Anatomie de Berne dont les travaux portent sur la régénération cardiaque chez le poisson adulte, l'extension de ce projet au cœur mature semblait intéressante. Le cœur adulte, bien que plus difficile à imager qu'au stade précoce, permet notamment l'étude de la cicatrisation du muscle cardiaque [4]. En particulier, le signal SHG nous permettrait d'étudier l'influence du collagène au cours de ce processus, présent dans le cœur aux stades tardifs et jouant un rôle majeur dans la régénération cardiaque du poisson.

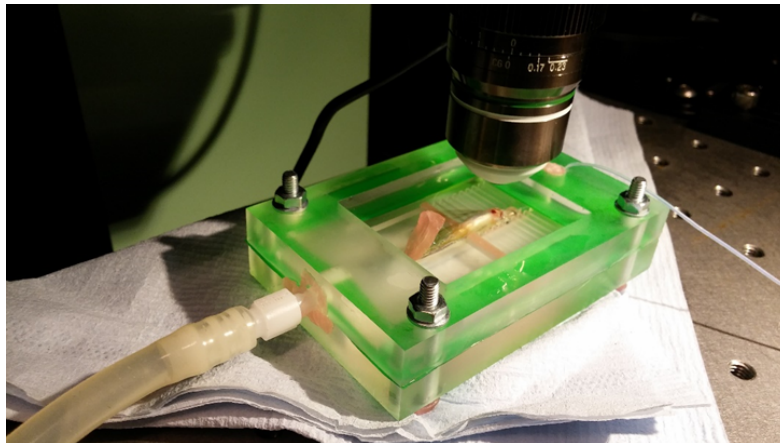


FIGURE 3.66: Montage expérimental pour l'observation du cœur de poisson-zèbre adulte *ex vivo* sous le TriMScope.

Nous avons obtenu de par cette collaboration quelques résultats préliminaires sur le cœur arrêté d'abord, grâce l'expertise de montage d'Alexander Ernst, étudiant en thèse du groupe de Nadia Mercader. Le problème majeur associé à l'observation du cœur adulte concerne le montage : le cœur ne peut être observé *in vivo* en transmission, puisque le cœur est niché dans le poisson opaque. Ainsi, le montage figure 3.66 présente un essai d'imagerie, où le cœur a été légèrement extrait du thorax du poisson. Nous avons alors procédé aux acquisitions, pour lesquels les signaux en épi-détection et en transmission ont été collectés. Les résultats de l'acquisition SHG sur cœur *ex vivo* arrêté sont présentés 3.67. L'image en transmission est assez conforme aux images que nous avons obtenues sur les poissons plus jeunes : on distingue clairement les fibres musculaires enchevêtrées, mais on remarque également la forme caractéristique du collagène en périphérie. L'image en épi-détection quant à elle ne présente quasiment pas de signal provenant des fibres musculaire. Malgré cela le signal du collagène est fort, et on remarque que la protéine est abondante à la surface du cœur chez le poisson adulte, contrairement aux stades plus précoces.

Ainsi, l'objectif est alors ici d'optimiser le montage et la détection en vue de pouvoir observer le processus de cicatrisation. La SHG est alors le mode de contraste idéal, permettant de révéler conjointement le collagène permettant la cicatrisation, et la réparation des fibres musculaire du coeur.

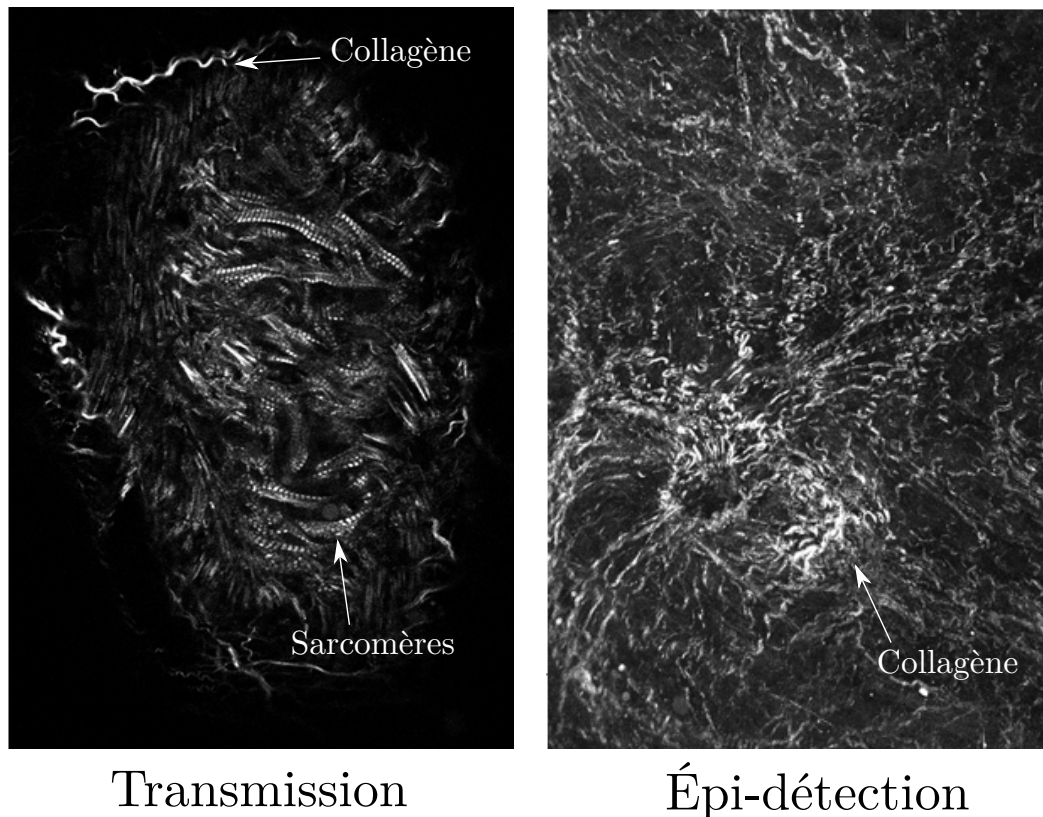


FIGURE 3.67: Acquisition sur cœur adulte arrêté *ex vivo*, en épi-détection et en transmission. (a) Détection en transmission. Le signal SHG des fibres est fort, et l'on distingue du collagène ponctuellement sur les bords de l'image. (b) Épi-détection. Le signal SHG provenant des fibres musculaire est à peine visible; en revanche, le collagène en surface est très intense.  $\lambda = 1150 \text{ nm}$ ;  $0.5 \mu\text{m}/\text{px}$ .

**Imagerie dynamique** Grâce à ces résultats préliminaires, l'étude dynamique du collagène au sein du cœur de poisson adulte pourrait donner de précieuses informations sur les mécanismes de régénération cardiaque spécifique à ce modèle. Au moment de ces acquisitions, la référence n'était pas encore implémentée sur le montage; nous n'avons pas eu l'occasion d'imager ces structures dynamiquement. Le modèle du cœur adulte ressemble, dans ses limitations et de par ses dimensions à celui de l'embryon de poulet. La forte dynamique du cœur peut alors rendre l'imagerie d'un plan difficile, tant celui-ci peut bouger au cours du cycle de contraction et sortir du champ de vue, en particulier en  $z$ . Toutefois, l'étude du poisson adulte propose un avantage de taille : on n'observe plus de morphogenèse, le coeur ne se développe plus, et est par ailleurs plus robuste à l'illumination. Ainsi, nous pouvons conduire des acquisitions très longues, en 3D et ainsi reconstruire de gros volumes d'images sans craindre de dérives de l'image dues à la morphogenèse.

Enfin, pour permettre les acquisitions *in vivo* et avec la difficulté d'obtenir un signal en transmission, il faudra miser sur la géométrie d'épi-détection. Il faudra par ailleurs modifier astucieusement l'illumination de la référence pour que celle-ci puisse proposer une modulation du coeur adulte. À l'instar du poulet présentant un contraste de référence très forte, il paraît cohérent d'avancer qu'elle le sera aussi pour le coeur de poisson-zèbre adulte.

### 3.4.3 Imagerie calcique

Dans la section précédente, nous avons détaillé quelques applications de l'imagerie multimodale de la méthode XTYZ, comme notamment l'observation des valves dynamiquement par marquage de l'endocarde. Dans cette section, nous aborderons une autre perspective prometteuse : une approche multimodale couplant la SHG avec un rapporteur calcique en fluorescence permettrait d'aborder la question du couplage électromécanique dans le muscle cardiaque *in vivo* à bonnes résolutions temporelles et spatiales.

Au cours de ce projet, des images XTY préliminaires ont été reconstruites sur des lignées transgéniques GCamp, permettant de visualiser l'activité des ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'échelle des cellules individuelles. Déjà largement utilisés en neurobiologie à l'étude de l'activité neuronale [77], l'objectif serait ici de comprendre le lien entre les vagues de calcium se propageant dans le cœur et leur influence sur la contraction cardiaque, comme il a déjà pu être étudié sur les cardiomyocytes isolés [39; 78]. Grâce à notre méthode et à l'imagerie multimodale, nous pourrions établir une relation dynamique entre la vague ionique repérée en fluorescence, et la contraction des fibres en SHG, *in vivo*.

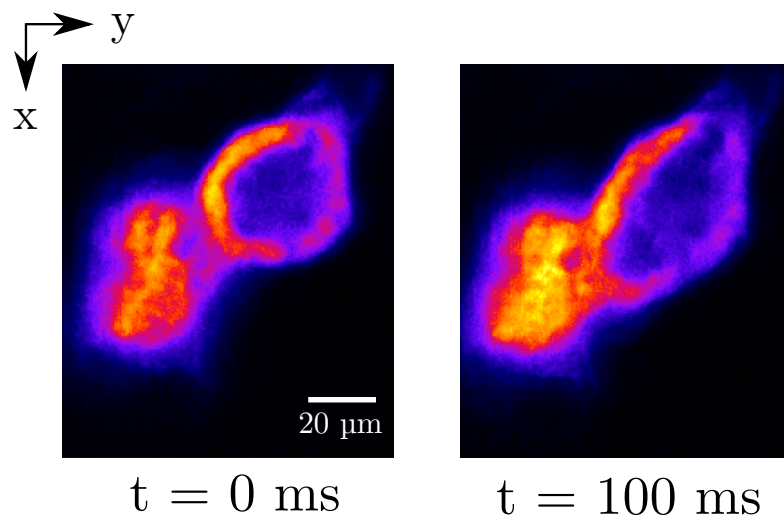


FIGURE 3.68: Imagerie XTY à 800 Hz d'un cœur dont les rapporteurs calciques sont marqués. L'image est présentée à deux instants de la contraction. Le signal présenté correspond au signal normalisé du signal calcique par un signal de référence, en fluorescence. 217x188 pixels ; période 287 ms ; 800 Hz ; résolution 1.0  $\mu\text{m}/\text{px}$ .

La figure 3.68 expose les résultats préliminaire à l'imagerie XTY sur le cœur d'un poisson issu d'une lignée transgénique GCamp. Sur cette image XTY dynamique reconstruite à 800 Hz, on peut distinguer la vague de calcium se propager au cours du temps. Il s'agit alors dans le futur, d'optimiser ces acquisitions multimodales pour en tirer des conclusions biologiquement significatives. L'imagerie XTYZ semble ici aussi tout à fait adaptée à l'observation du couplage électromécanique : l'aspect multimodal permettrait alors de coupler le contraste des rapporteurs calciques avec la contraction des sarcomères, avec des résolutions temporelles et spatiales inédites.

### 3.4.4 Systèmes périodiques ou stimulables

Dans tout ce chapitre, nous avons uniquement appliqué la méthode XTYZ à l'étude du cœur. Dans le cas général, la méthode reste valide pour tout système présentant un mouvement périodique. Pour transposer la méthode à un autre modèle que le cœur, la difficulté réside essentiellement dans la compatibilité des échelles temporelles et spatiales ; celles-ci qui



doivent se trouver dans la gamme pertinente à l'imagerie multiphoton. Ainsi, les modèles périodiques qui partagent ces échelles spatiales (résolution spatiale micrométrique) et temporelles (résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde), peuvent tout à fait prétendre à être reconstruits par la méthode développée ici. Parmi les exemples immédiats de portabilité de la méthode, on peut citer notamment l'étude des pompes musculaires chez les moustiques, permettant d'aspirer du liquide à des fréquences d'environ 4 Hz, pour des échelles spatiales de l'ordre du micromètre [79]. À des fréquences plus élevées, nous pourrions également nous intéresser au mouvement rapide des ailes de drosophiles [80]. Avec une fréquence de battement pouvant atteindre les 1000 Hz pour une taille de quelques millimètres [81], l'étude du modèle des muscles du vol chez la drosophile requiert des vitesses d'imageries très élevées, en particulier à l'échelle spatiale des sarcomères. Ce type de problèmes est alors tout à fait adapté aux échelles temporelles et spatiales proposées par l'imagerie XYTZ et peut constituer une autre perspective d'application intéressante. Finalement, nous pouvons également nous intéresser à un modèle dont les échelles temporelles et spatiales paraissent toutes indiquées à l'imagerie XTYZ : les cils cellulaires.

**Application aux cils cellulaires** Résoudre le mouvement du cil cellulaire battant en 3D au sein de la vésicule de Kupffer nous renseignerait d'informations très utiles à la compréhension de la génération du flux au sein de la cavité. L'étude des cils semblait donc être une perspective intéressante d'application directe de l'imagerie XTYZ. Du fait des différences entre les deux modèles, la transposition requiert cependant un développement spécifique pour permettre d'obtenir des résultats probants. Dans ce paragraphe, nous développerons ces différences, les essais préliminaires et naturellement les stratégies envisagées à l'imagerie de ces organites.

Le modèle du cil est différent de celui du cœur, à commencer par les dimensions temporelles et spatiales de son mouvement. Le cil motile mesure environ 5  $\mu\text{m}$ , et suit un mouvement de précession. En moyenne un cil bat environ 30 à 50 fois par seconde, soit une période d'environ 25 ms par cycle. Il existe deux principales difficultés à son imagerie par la méthode XTYZ. La première réside dans le fait que les cils sont assez densément regroupés, ce qui rend problématique leur observation individuelle. En particulier, il est difficile de faire en sorte que le signal de référence soit modulé par un unique cil. Pour répondre à ce problème, il faut adapter la référence pour qu'elle soit plus spécifique au plan de l'image. Une des idées est alors d'utiliser comme référence une ligne laser statique supplémentaire, par ailleurs disponible sur le dispositif TriMScope. Le second défi est ensuite que la structure linéaire du cil complique la reconstruction par maximisation de correspondance. En effet, l'algorithme cherche à minimiser les écarts spatiaux entre les images en les synchronisant temporellement, quand bien même ces variations spatiales sont réelles. Pour un cil, pour lequel le mouvement est vraisemblablement celui d'une précession d'une tige souple, l'algorithme aura nécessairement tendance à reconstruire un bâtonnet rigide, peu représentatif de la réalité biologique. La référence est alors indispensable à assurer la pertinence biologique de l'image reconstruite, en rendant la synchronisation *exacte*.

La figure 3.69 illustre une tentative de reconstruction d'un cil motile au sein du canal central (une zone où les cils sont facilement repérables), sans utilisation de référence, par maximisation de correspondance. Ces cils sont particulièrement longs (une dizaine de micromètres) et leur mouvement ressemble à un mouvement de précession couplé à un battement en tire-bouchon caractéristique des structures souples (*corkscrew motion* en anglais). Sur l'image (a), il semble que les cycles spatiaux sont robustes au cours du temps. Grâce à la fréquence élevée de battement des cils, nous choisissons d'acquérir un nombre important de cycles, en balayant chaque ligne durant un temps raisonnable. Pouvoir acquérir autant de cycles peut permettre de procéder à un moyennage a posteriori, et ainsi extraire le mouvement typique

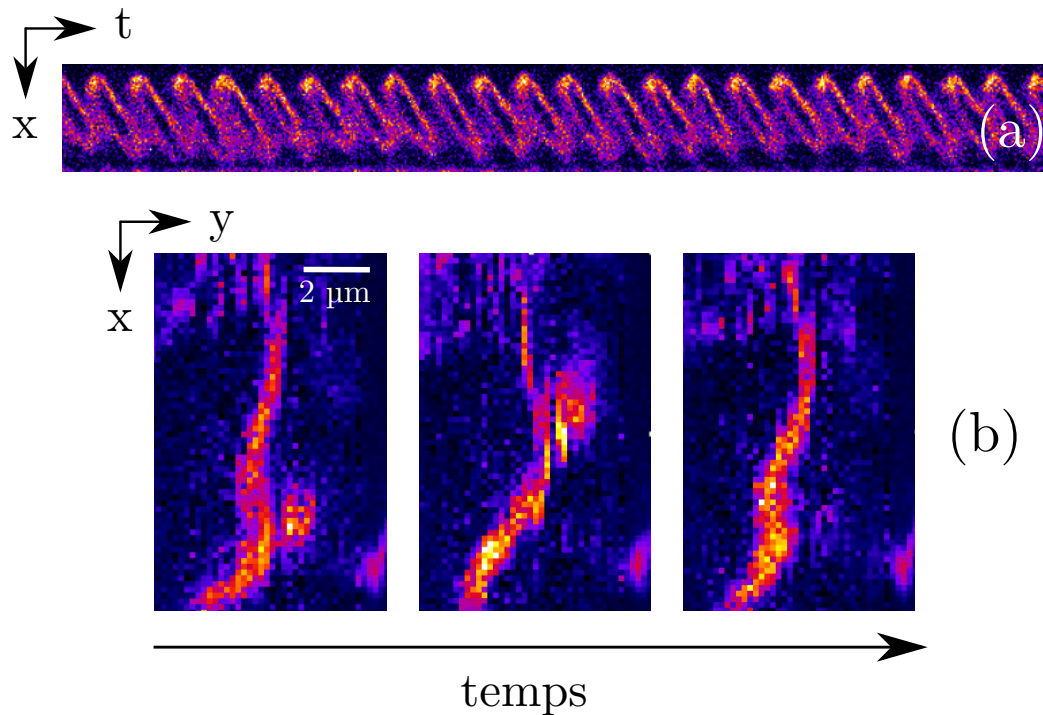


FIGURE 3.69: Tentative de reconstruction d'un cil cellulaire motile par la méthode XTY à 1200 Hz. (a) décrit le kymogramme d'une ligne  $y$  du cil imagé. (b) correspond à la tentative de reconstruction par la méthode de maximisation de la correspondance, à différents points temporels.  $71 \times 42$  pixels; résolution  $0.16 \mu\text{m}/\text{px}$ ; période 23 ms; 1200 Hz; arl13b :GFP;  $\lambda = 900 \text{ nm}$ .

du cil. Le résultat de cette reconstruction préliminaire est présenté au (b). La reconstruction génère une image où les artefacts dus à la maximisation de correspondance sont clairement visibles; on observe de multiples cassures et des vagues de propagation artefactuelles du cil. Dans le cas d'une structure aussi simple que celle du cil, cette méthode est alors très peu *exacte*. L'implémentation d'une référence adaptée semble donc indispensable à la reconstruction des cils battants.

Cette perspective semble alors très intéressante et pourrait apporter de nombreuses réponses aux questions de la génération du flux par un cil individuel, et donc du flux total dans la vésicule de Kupffer. Bien que nécessitant un développement spécifique à ce modèle, en particulier une implémentation adaptée de la référence, l'imagerie XTY semble pertinente à la résolution de ce mouvement à très haute vitesse. En effet, le signal de fluorescence des cils est fort, le phénomène est relativement robuste spatialement et temporellement; les nombreuses périodes que l'on collecte pourraient alors permettre la reconstruction d'un mouvement typique de battement du cil dans l'espace.

**Phénomènes stimulables** En réalité, la technique que nous avons développée n'est en fait pas spécifique aux mouvements périodiques, mais peut tout aussi bien s'appliquer à des mouvements *stimulables*. Par ce terme, on désigne les phénomènes qui peuvent être répétés, passivement ou activement au moyen d'une stimulation, et qui présentent une dynamique robuste d'un événement à l'autre. Dans le cas du cœur, ce mouvement répétable correspond à la contraction sur un cycle cardiaque, et se répète périodiquement. Cependant, la méthode serait tout à fait pertinente, au moyen d'une adaptation de la chaîne de traitement, si le cœur était stimulé artificiellement. Il s'agit alors de déclencher l'événement (le cycle de contraction dans le cas du cœur) de manière synchronisée à l'acquisition, autant de fois que nécessaire pour collecter l'information requise. Grâce à la résolution temporelle permise par la technique, nous

pouvons envisager par exemple de procéder à l'imagerie calcique dynamique dans le cerveau. Il faut alors reconsidérer les contraintes techniques, de même que de redéfinir l'implémentation de la référence dans leur contexte biologique.

### 3.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit le développement de l'imagerie XTYZ, une méthode d'acquisition et de reconstruction d'images originale basée sur la synchronisation de séquences en ligne. Elle permet d'exploiter la périodicité des mouvements cardiaques pour reconstruire des images tridimensionnelles avec une résolution temporelle effective de l'ordre de la milliseconde (1000 volumes/secondes) sans compromettre ni la résolution spatiale du microscope (inférieure au micromètre latéralement) ni le temps d'acquisition par pixel (1-5  $\mu$ s). Nous avons démontré quantitativement que la reconstruction est à la fois exacte et précise, mais est également robuste aux arythmies temporelles du cycle cardiaque. Il est possible d'utiliser l'approche pour mettre en place un débruitage par repliement des cycles pour travailler, notamment, avec de faibles signaux. Nous avons appliqué cette approche à l'imagerie SHG des fibres musculaires cardiaques dans l'embryon de poisson-zèbre et montré qu'il était possible de capturer la dynamique de contraction des sarcomères dans un cœur *in vivo* et sans marquage avec une résolution spatio-temporelle sans précédent (environ 1  $\mu$ m et 1 ms). La résolution spatiale est suffisante pour mesurer la taille des sarcomères et la résolution temporelle permet de suivre les mouvements les plus rapides du cœur sans artefact de flou cinétique. L'imagerie SHG *in vivo* et rapide à 1000 volumes par seconde constitue une avancée majeure dans ce domaine. Nous avons également montré que l'imagerie multiphoton multimodale combinant signaux de fluorescence et d'harmoniques était possible. Nous pouvons notamment utiliser la vitesse maximale de balayage de notre microscope pour obtenir des images de fluorescence à 1200 Hz, et ainsi capturer le mouvement des valves cardiaques, les structures les plus dynamiques du cœur.

Finalement, pour démontrer que cette approche n'est pas spécifique au cœur de l'embryon de poisson-zèbre, nous avons appliqué l'imagerie SHG rapide à l'embryon de poulet, un autre système modèle pour lequel les lignés transgéniques présentant un marquage fluorescent sont beaucoup plus rares. Cette approche ouvre sur de nombreuses perspectives de développements ou d'applications, à la fois pour étudier la morphogénèse et la régénération du cœur d'embryon de poisson-zèbre, mais aussi, plus largement, pour l'appliquer à d'autres processus biologiques périodiques ou excitables.

### 3.6 Références

- [1] Petros Nemtsas, Erich Wettwer, Torsten Christ, Gilbert Weidinger, and Ursula Ravens. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1) :161–171, jan 2010. [94](#)
- [2] Robert N. Wilkinson, Chris Jopling, and Fredericus J.M. van Eeden. Zebrafish as a Model of Cardiac Disease. In *Progress in molecular biology and translational science*, volume 124, pages 65–91. 2014. [94](#)
- [3] Chi Chi Liu, Li Li, Yun Wah Lam, Chung Wah Siu, and Shuk Han Cheng. Improvement of surface ECG recording in adult zebrafish reveals that the value of this model exceeds our expectation. *Scientific Reports*, 6(1) :25073, jul 2016. [94](#)
- [4] K. D. Poss, Lindsay G Wilson, and Mark T Keating. Heart Regeneration in Zebrafish. *Science*, 298(5601) :2188–2190, dec 2002. [95](#), [185](#)

- [5] T. Dahme, H. A. Katus, and W. Rottbauer. Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease. *Disease Models and Mechanisms*, 2(1-2) :18–22, jan 2009. [95](#)
- [6] Jeroen Bakkers. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovascular research*, 91(2) :279–88, jul 2011. [96](#)
- [7] HUGH HUXLEY and JEAN HANSON. Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature*, 173(4412) :973–976, may 1954. [97](#)
- [8] A. F. HUXLEY and R. NIEDERGERKE. Structural Changes in Muscle During Contraction : Interference Microscopy of Living Muscle Fibres. *Nature*, 173(4412) :971–973, may 1954. [97](#)
- [9] T J Burkholder and R L Lieber. Sarcomere length operating range of vertebrate muscles during movement. *The Journal of experimental biology*, 204(Pt 9) :1529–36, may 2001. [97](#), [99](#)
- [10] A Cutts. The range of sarcomere lengths in the muscles of the human lower limb. *Journal of anatomy*, 160 :79–88, oct 1988. [97](#)
- [11] Eng Kuan Moo, Rafael Fortuna, Scott C Sibole, Ziad Abusara, and Walter Herzog. In vivo Sarcomere Lengths and Sarcomere Elongations Are Not Uniform across an Intact Muscle. *Frontiers in physiology*, 7 :187, 2016. [97](#), [102](#)
- [12] Paul J Campagnola, Andrew C Millard, Mark Terasaki, Pamela E Hoppe, Christian J Malone, and William A Mohler. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical journal*, 82(1 Pt 1) :493–508, jan 2002. [98](#)
- [13] Paul J Campagnola and Leslie M Loew. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1356–1360, nov 2003. [102](#)
- [14] William Mohler, Andrew C. Millard, and Paul J. Campagnola. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, 29(1) :97–109, jan 2003. [98](#), [99](#)
- [15] Hind A Al-Khayat. Three-dimensional structure of the human myosin thick filament : clinical implications. *Global cardiology science & practice*, 2013(3) :280–302, 2013. [99](#), [100](#)
- [16] Sergey V Plotnikov, Andrew C Millard, Paul J Campagnola, and William A Mohler. Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres. *Biophysical journal*, 90(2) :693–703, jan 2006. [99](#), [100](#), [102](#), [104](#), [168](#)
- [17] Thierry Boulesteix, Emmanuel Beaurepaire, Martin-Pierre Sauviat, and Marie-Claire Schanne-Klein. Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes : measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy. *Optics Letters*, 29(17) :2031, sep 2004. [101](#), [102](#)
- [18] Sven Reischauer, Rima Arnaout, Radhan Ramadass, and Didier Y.R. Stainier. Actin Binding GFP Allows 4D In Vivo Imaging of Myofilament Dynamics in the Zebrafish Heart and the Identification of Erbb2 Signaling as a Remodeling Factor of Myofibril Architecture. *Circulation Research*, 115(10) :845–856, oct 2014. [99](#), [100](#)

- [19] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1369–1377, nov 2003. [99](#), [124](#)
- [20] Jianmei Liu, Ying Jin, Hanping Liu, Feifei Wang, and Xiaoyuan Deng. The forward and backward second-harmonic generation from crystallized collagen fibre with tightly focused linearly polarized beams. *Journal of Optics*, 14(5) :055301, may 2012. [100](#), [102](#)
- [21] L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz. Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 17(10) :1685, oct 2000.
- [22] François Légaré, Christian Pfeffer, and Bjorn R Olsen. The role of backscattering in SHG tissue imaging. *Biophysical journal*, 93(4) :1312–20, aug 2007. [100](#)
- [23] Markus Rehberg, Fritz Krombach, Ulrich Pohl, and Steffen Dietzel. Label-Free 3D Visualization of Cellular and Tissue Structures in Intact Muscle with Second and Third Harmonic Generation Microscopy. *PLoS ONE*, 6(11) :e28237, nov 2011. [100](#)
- [24] Pierre Mahou. Microscopie non linéaire de tissus biologiques : excitation multicolore, faisceaux de Bessel, et excitation en nappe de lumière. dec 2012. [100](#)
- [25] Julien Vermot, Scott E. Fraser, and Michael Liebling. Fast fluorescence microscopy for imaging the dynamics of embryonic development. *HFSP Journal*, 2(3) :143–155, jun 2008. [101](#)
- [26] J. Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, aug 2004. [101](#)
- [27] Rory M Power and Jan Huisken. A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nature Methods*, 14(4) :360–373, apr 2017. [101](#)
- [28] Michael Liebling, Arian S. Forouhar, Ralf Wolleschensky, Bernhard Zimmermann, Richard Ankerhold, Scott E. Fraser, Morteza Gharib, and Mary E. Dickinson. Rapid three-dimensional imaging and analysis of the beating embryonic heart reveals functional changes during development. *Developmental Dynamics*, 235(11) :2940–2948, nov 2006. [101](#)
- [29] Paul J Scherz, Jan Huisken, Pankaj Sahai-Hernandez, and Didier Y R Stainier. High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function. *Development (Cambridge, England)*, 135(6) :1179–87, mar 2008. [101](#), [172](#)
- [30] Pierre Mahou, Julien Vermot, Emmanuel Beaurepaire, and Willy Supatto. Multicolor two-photon light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 11(6) :600–601, jun 2014. [101](#), [108](#), [109](#)
- [31] Michaela Mickoleit, Benjamin Schmid, Michael Weber, Florian O Fahrbach, Sonja Hombach, Sven Reischauer, and Jan Huisken. High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart. *Nature Methods*, 11(9) :919–922, sep 2014. [101](#), [102](#), [105](#), [109](#), [135](#), [146](#)
- [32] Christian P Pfeffer, Bjorn R Olsen, Feruz Ganikhanov, and François Légaré. Imaging skeletal muscle using second harmonic generation and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Biomedical optics express*, 2(5) :1366–76, apr 2011. [102](#)
- [33] William P. Dempsey, Nathan O. Hodas, Aaron Ponti, and Periklis Pantazis. Determination of the source of SHG verniers in zebrafish skeletal muscle. *Scientific Reports*, 5(1) :18119, nov 2016. [102](#)

- [34] Yu-Wei Chiu. Second-harmonic generation imaging of collagen fibers in myocardium for atrial fibrillation diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2) :026002, mar 2010. [102](#), [103](#)
- [35] Samuel J. Wallace, Janna L. Morrison, Kimberley J. Botting, and Tak W. Kee. Second-harmonic generation and two-photon-excited autofluorescence microscopy of cardiomyocytes : quantification of cell volume and myosin filaments. *Journal of Biomedical Optics*, 13(6) :064018, 2008. [102](#)
- [36] Michael E Llewellyn, Robert P J Barretto, Scott L Delp, and Mark J Schnitzer. Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans. *Nature*, 454(7205) :784–8, aug 2008. [104](#), [165](#), [168](#)
- [37] Emmanuelle Chaigneau, Martin Oheim, Etienne Audinat, and Serge Charpak. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22) :13081–6, oct 2003. [104](#)
- [38] Justin C. Williams and Paul J. Campagnola. Wearable Second Harmonic Generation Imaging : The Sarcomeric Bridge to the Clinic. *Neuron*, 88(6) :1067–1069, dec 2015. [105](#)
- [39] Samir Awasthi, Leighton T. Izu, Ziliang Mao, Zhong Jian, Trevor Landas, Aaron Lerner, Rafael Shimkunas, Rahwa Woldeyesus, Julie Bossuyt, Brent M. Wood, Yi-Je Chen, Dennis L. Matthews, Deborah K. Lieu, Nipavan Chiamvimonvat, Kit S. Lam, Ye Chen-Izu, and James W. Chan. Multimodal SHG-2PF Imaging of Microdomain Ca<sup>2+</sup> -Contraction Coupling in Live Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 118(2), jan 2016. [105](#), [187](#)
- [40] Jonathan M Taylor. Optically gated beating-heart imaging. *Frontiers in Physiology*, 2014. [106](#), [107](#)
- [41] M. Liebling, A. S. Forouhar, M. Gharib, S. E. Fraser, and M. E. Dickinson. Wavelet-based synchronization of nongated confocal microscopy data for 4D imaging of the embryonic heart. In M. Papadakis, M.A. Unser, and A.F. Laine, editors, *Wavelets : Applications in Signal and Image Processing XI*, volume 5914, pages 591409 1–6, San Diego CA, USA, Jul. 31–Aug. 4 2005. Proc. SPIE. [106](#), [108](#), [109](#), [110](#), [111](#), [112](#), [136](#), [137](#), [145](#), [149](#)
- [42] J. Kuntz, J. Dinkel, S. Zwick, T. Bäuerle, M. Grasruck, F. Kiessling, R. Gupta, W. Semmler, and S. H. Bartling. Fully automated intrinsic respiratory and cardiac gating for small animal CT. *Physics in Medicine and Biology*, 55(7) :2069–2085, apr 2010. [106](#)
- [43] Claudio Vinegoni, Sungon Lee, Paolo Fumene Feruglio, and Ralph Weissleder. Advanced Motion Compensation Methods for Intravital Optical Microscopy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 20(2) :83–91, mar 2014. [106](#)
- [44] Sundeep Singh Dhillon, Éva Dóró, István Magyary, Stuart Egginton, Attila Sík, and Ferenc Müller. Optimisation of Embryonic and Larval ECG Measurement in Zebrafish for Quantifying the Effect of QT Prolonging Drugs. *PLoS ONE*, 8(4) :e60552, apr 2013. [107](#)
- [45] Michael W. Jenkins, Osman Q. Chughtai, Ajay N. Basavanhally, Michiko Watanabe, and Andrew M. Rollins. In vivo gated 4D imaging of the embryonic heart using optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 12(3) :030505, 2007. [107](#)
- [46] Hung Cao, Fei Yu, Yu Zhao, Xiaoxiao Zhang, Joyce Tai, Juhyun Lee, Ali Darehzereshki, Malcolm Bersohn, Ching-Ling Lien, Neil C Chi, Yu-Chong Tai, and Tzung K Hsiai. Wearable multi-channel microelectrode membranes for elucidating electrophysiological phenotypes of injured myocardium. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 6(8) :789–95, aug 2014. [107](#)

- [47] Michael Liebling, Arian S. Forouhar, Morteza Gharib, Scott E. Fraser, and Mary E. Dickinson. Four-dimensional cardiac imaging in living embryos via postacquisition synchronization of nongated slice sequences. *Journal of Biomedical Optics*, 10(5) :054001, 2005. [112](#)
- [48] S. Mallat. A theory for multiresolution signal decomposition : the wavelet representation. Technical Report 7, 1989. [112](#)
- [49] Pierre Mahou, Guy Malkinson, Élodie Chaudan, Thierry Gacoin, Emmanuel Beaurepaire, and Willy Supatto. Metrology of Multiphoton Microscopes Using Second Harmonic Generation Nanoprobes. *Small*, 13(42) :1701442, nov 2017. [124](#)
- [50] Wolfgang Rottbauer, Keith Baker, Z.Galen Wo, Manzoor-Ali P.K. Mohideen, Horacio F. Cantiello, and Mark C. Fishman. Growth and Function of the Embryonic Heart Depend upon the Cardiac-Specific L-Type Calcium Channel  $\alpha 1$  Subunit. *Developmental Cell*, 1(2) :265–275, aug 2001. [125](#)
- [51] Mikhail Drobizhev, Nikolay S Makarov, Shane E Tillo, Thomas E Hughes, and Aleksander Rebane. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8(5) :393–399, may 2011. [126](#)
- [52] Antonia Borovina, Simone Superina, Daniel Voskas, and Brian Ciruna. Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nature Cell Biology*, 12(4) :407–412, apr 2010. [130](#)
- [53] Li-Kun Phng, Fabio Stanchi, and Holger Gerhardt. Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development*, 140(19) :4031–4040, oct 2013. [130](#)
- [54] Hyung-song Nam and Robert Benezra. High Levels of Id1 Expression Define B1 Type Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 5(5) :515–526, nov 2009. [130](#)
- [55] L. A. Trinh, T. Hochgreb, M. Graham, D. Wu, F. Ruf-Zamojski, C. S. Jayasena, A. Saxena, R. Hawk, A. Gonzalez-Serricchio, A. Dixson, E. Chow, C. Gonzales, H.-Y. Leung, I. Solomon, M. Bronner-Fraser, S. G. Megason, and S. E. Fraser. A versatile gene trap to visualize and interrogate the function of the vertebrate proteome. *Genes & Development*, 25(21) :2306–2320, nov 2011. [130](#)
- [56] Daniel Brown, Leigh Samsa, Li Qian, Jiandong Liu, Daniel R. Brown, Leigh Ann Samsa, Li Qian, and Jiandong Liu. Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3(2) :13, apr 2016. [130](#)
- [57] Chereen Collymore, Angela Tolwani, Christine Lieggi, and Skye Rasmussen. Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 53(2) :198–203, mar 2014. [131](#)
- [58] Donald L Neiffer and M Andrew Stamper. Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia : considerations, methods, and types of drugs. *ILAR journal*, 50(4) :343–60, 2009. [131](#)
- [59] Johnny Karlsson, Jonas von Hofsten, and Per-Erik Olsson. Generating Transparent Zebrafish : A Refined Method to Improve Detection of Gene Expression During Embryonic Development. *Marine Biotechnology*, 3(6) :0522–0527, nov 2001. [132](#)
- [60] Stellingwerf R. PERIOD DETERMINATION USING PHASE DISPERSION MINIMIZATION. *953S The Astrophysical Journal*, 224 :953–960, 1978. [136](#)

- [61] A.F. Linnell Nemeč and James M Nemeč. Summary for Policymakers. Technical Report 11, 1985. [136](#)
- [62] M M Dworetzky. A period-finding method for sparse randomly spaced observations of 'How long is a piece of string?'. *Monthly Notices Of The Royal Astronomical Society*, 203(3) :917–924, aug 1983. [136](#)
- [63] P Philippe Laissue, Rana A Alghamdi, Pavel Tomancak, Emmanuel G Reynaud, and Hari Shroff. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nature Methods*, 14(7) :657–661, jun 2017. [162](#)
- [64] Fuyu Kobirumaki-Shimozawa, Kotaro Oyama, Togo Shimozawa, Akari Mizuno, Takashi Ohki, Takako Terui, Susumu Minamisawa, Shin'ichi Ishiwata, and Norio Fukuda. Nano-imaging of the beating mouse heart in vivo : Importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length per se, in the regulation of cardiac function. *The Journal of general physiology*, 147(1) :53–62, jan 2016. [168](#)
- [65] Seine A Shintani, Kotaro Oyama, Fuyu Kobirumaki-Shimozawa, Takashi Ohki, Shin'ichi Ishiwata, and Norio Fukuda. Sarcomere length nanometry in rat neonatal cardiomyocytes expressed with  $\alpha$ -actinin-AcGFP in Z discs. *The Journal of general physiology*, 143(4) :513–24, apr 2014. [168](#)
- [66] Christoph S Clemen, Harald Herrmann, Sergei V Strelkov, and Rolf Schröder. Desminopathies : pathology and mechanisms. *Acta neuropathologica*, 125(1) :47–75, jan 2013. [168](#)
- [67] Caroline Ramspacher, Emily Steed, Francesco Boselli, Rita Ferreira, Nathalie Faggianelli, Stéphane Roth, Coralie Spiegelhalter, Nadia Messaddeq, Le Trinh, Michael Liebling, Nikhil Chacko, Federico Tessadori, Jeroen Bakkers, Jocelyn Laporte, Karim Hnia, and Julien Vermot. Developmental Alterations in Heart Biomechanics and Skeletal Muscle Function in Desmin Mutants Suggest an Early Pathological Root for Desminopathies. *Cell Reports*, 11(10) :1564–1576, jun 2015. [168](#), [169](#)
- [68] Sevan Goenezen, Monique Y. Rennie, and Sandra Rugonyi. Biomechanics of early cardiac development. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(8) :1187–1204, nov 2012. [175](#)
- [69] Brad J. Martinsen. Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Developmental Dynamics*, 233(4) :1217–1237, aug 2005. [175](#)
- [70] HIROSHI ONO, PING-CHUN LUCY HOU, and HIROSHI TAZAWA. RESPONSES OF DEVELOPING CHICKEN EMBRYOS TO ACUTE CHANGES IN AMBIENT TEMPERATURE : NONINVASIVE STUDY OF HEART RATE. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 40(3-4) :467–479, may 1994. [176](#)
- [71] Viktor Hamburger and Howard L. Hamilton. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195(4) :231–272, dec 1992. [176](#)
- [72] Susan C. Chapman, Jrme Collignon, Gary C. Schoenwolf, and Andrew Lumsden. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Developmental Dynamics*, 220(3) :284–289, mar 2001. [176](#)
- [73] George A. Porter, Ryan F. Makuck, and Scott A. Rivkees. Intracellular calcium plays an essential role in cardiac development. *Developmental Dynamics*, 227(2) :280–290, jun 2003. [176](#)



- [74] Changsheng Yang and Maureen Stone. Dynamic programming method for temporal registration of three-dimensional tongue surface motion from multiple utterances. *Speech Communication*, 38(1-2) :201–209, sep 2002. [181](#)
- [75] M. Liebling, J. Vermot, A.S. Forouhar, M. Gharib, M.E. Dickinson, and S.E. Fraser. Nonuniform Temporal Alignment of Slice Sequences for Four-Dimensional Imaging of Cyclically Deforming Embryonic Structures. In *3rd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : Macro to Nano, 2006.*, pages 1156–1159. IEEE. [181](#)
- [76] V Nucciotti, C Stringari, L Sacconi, F Vanzi, L Fusi, M Linari, G Piazzesi, V Lombardi, and F S Pavone. Probing myosin structural conformation in vivo by second-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17) :7763–8, apr 2010. [184](#)
- [77] Akira Muto, Masamichi Ohkura, Gembu Abe, Junichi Nakai, and Koichi Kawakami. Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Current biology : CB*, 23(4) :307–11, feb 2013. [187](#)
- [78] Silvia Guatimosim, Cristina Guatimosim, and Long-Sheng Song. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 689 :205–14, 2011. [187](#)
- [79] Kenji Kikuchi, Mark A Stremmler, Souvick Chatterjee, Wah-Keat Lee, Osamu Mochizuki, and John J Socha. Burst mode pumping : A new mechanism of drinking in mosquitoes OPEN. *SciENTific REPORTS* |, 8 :4885, 2018. [188](#)
- [80] F O Lehmann and M H Dickinson. The changes in power requirements and muscle efficiency during elevated force production in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 200(7), 1997. [188](#)
- [81] Cornelia Schönbauer, Jutta Distler, Nina Jährling, Martin Radolf, Hans-Ulrich Dodt, Manfred Frasch, and Frank Schnorrer. Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects. 2011. [188](#)

# Conclusion

Par ces travaux de thèse, nous avons conduit l'étude de deux phénomènes biologiques périodiques : le cil cellulaire motile et le coeur battant. En tirant profit de la propriété de périodicité, nous avons contourné les limites de vitesse des développements actuels en microscopie multiphoton, au moyen de deux stratégies différentes et complémentaires. Grâce à elles, l'étude de ces phénomènes a été rendue possible à différentes échelles.

Au cours du Chapitre 2, nous avons proposé une analyse systématique de milliers de cils sur plusieurs cas contrôlés ou perturbés au sein de la vésicule de Kupffer. Ceci a ainsi permis d'agréger une quantité importante d'informations nécessaire à une étude quantitative et statistique, et riche d'informations biologiques. En particulier, nous avons découvert une nouvelle forme de chiralité s'établissant au cours du temps, ouvrant la voie à une nouvelle hypothèse de mécanotransduction impliquée dans la spécification de l'axe gauche-droite. La chaîne de traitement ici développée, 3D-CiliaMap, est à ce jour rapide, ergonomique, et pourrait devenir un outil de caractérisation systématique des propriétés biophysiques des cils cellulaires en biologie du développement. De nombreuses perspectives d'amélioration sont envisageables, en particulier à l'aide de techniques d'apprentissage automatisé. La quantité importante de données annotées disponibles en font un problème de choix à l'utilisation de cette méthode, et pourrait permettre d'améliorer encore d'avantage les performances et la rapidité du traitement. Enfin, un dernier enjeu serait de parvenir à résoudre le mouvement dynamique du cil motile en 3D ; notre récent développement de l'imagerie XTYZ laisse à penser que cela sera possible dans un futur proche.

Finalement, le Chapitre 3 détaille le principe de l'imagerie XTYZ, son implémentation et la caractérisation de ses performances. Grâce à la périodicité, nous avons montré qu'il était possible de reconstruire de manière *exacte et précise* des images volumiques à plus de 1000 volumes par seconde, avec une résolution spatiale subcellulaire, et sans compromettre les autres paramètres d'acquisition. En particulier, nous avons réalisé des images dynamique en contraste SHG dans le muscle cardiaque *in vivo*, ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été entrepris auparavant. Grâce à cette modalité, nous avons pu suivre la contraction des sarcomères cardiaques, chez les embryons sauvages sans marquage et pour un modèle de myopathie, avec une résolution temporelle et spatiale sans précédent. Par ailleurs, cette stratégie a permis l'imagerie multimodale des valves, les structures les plus dynamiques du coeur, ce qui justifie la nécessité de telles vitesses d'acquisition. Nous avons finalement montré que cette méthode d'imagerie pouvait s'appliquer à d'autres organismes modèles, comme le coeur d'embryon de poulet. Les perspectives de développement de la méthode sont nombreuses, de même que ses sujets d'application. Parmi ceux-ci, on pourra citer l'étude multimodale du couplage électromécanique de la contraction cardiaque, ou, comme suggéré au paragraphe précédent, la reconstruction dynamique du mouvement des cils motiles.

Si la profondeur d'imagerie et la combinaison possible de fluorescence et de génération d'harmoniques, sont des avantages uniques de la microscopie multiphoton, la vitesse d'acquisition limite fortement l'imagerie de phénomènes biologiques rapides. Nous avons cependant démontré dans ce projet, qu'il est possible de contourner cette limite grâce à l'exploitation de

périodicités biologiques et au traitement numérique des images. Ainsi, nous avons pu extraire les propriétés biophysique des cils motiles ou capturer la dynamique du cœur embryonnaire sans marquage, ouvrant de nouvelles perspectives d'applications biologiques.



**Titre :** Stratégies d'imagerie multiphotonique avancées pour l'étude de processus périodiques rapides *in vivo* : des cils motiles au coeur battant

**Mots clés :** Microscopie multiphoton, Cils Cellulaires, Coeur battant, SHG,

**Résumé :** Les oscillateurs biologiques régissent le monde vivant à toutes les échelles. En biologie du développement, le cœur battant et les cils motiles en sont deux représentations dont les dimensions temporelles et spatiales sont analogues. Leur observation dynamique est un enjeu majeur pour permettre la compréhension de leur fonctionnement et des processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués. Dans ce manuscrit, nous nous proposons de résoudre leur mouvement tridimensionnel *in vivo* chez un organisme-modèle de vertébré : le poisson-zèbre. Pour contourner les limites actuelles de vitesse d'imagerie, nous utiliserons la propriété de périodicité de ces oscillateurs biologiques, afin de développer des stratégies innovantes d'imagerie rapide en microscopie multiphoton. D'abord, le cil cellulaire est une extension cytoplasmique que l'on retrouve dans presque toutes les cellules eucaryotes dont le rôle est de générer un flux biologique lorsqu'il est motile. Au cours des dernières années, leurs dysfonctionnements ont été identifiés dans un nombre croissant de pathologies, regroupées sous le terme de ciliopathies. En particulier, ils sont présents en nombre dans l'organisateur gauche-droite du poisson-zèbre, la vésicule de Kupffer. Le flux directionnel qu'ils génèrent est responsable de la brisure de symétrie gauche-droite aux stades précoces, le dernier axe biologique

à se spécifier chez les vertébrés. Dans ce manuscrit, nous détaillons une approche systématique d'analyse des cils cellulaires, exploitant les artefacts de balayage observés en microscopie multiphoton, issus du battement périodique de ceux-ci. Cette approche nous a notamment permis de découvrir une nouvelle forme d'asymétrie, ou de chiralité, apparaissant au sein de la vésicule de Kupffer. Par ailleurs, l'étude du cœur battant se heurte également à l'impossibilité de résoudre son mouvement rapide et en trois dimensions, par les techniques actuelles de microscopie. Dans ces travaux, nous proposons une méthode d'imagerie rapide à balayage point par point tirant profit de la propriété périodique du cœur, consistant en la synchronisation a posteriori de séquences de lignes balayées rapidement. Nous montrons que cette approche nous permet d'atteindre des résolutions temporelles sans précédent (de l'ordre de 1000 volumes par seconde), sans marquage, et sans compromettre d'autres paramètres d'acquisition (RSB, résolution spatiale, phototoxicité). En particulier, nous appliquons la méthode au suivi de la contraction des sarcomères cardiaques *in vivo* par génération de seconde harmonique (SHG), ainsi qu'à l'observation des valves cardiaques, les structures les plus dynamiques du cœur.

**Title :** Advanced multiphoton imaging strategies to investigate fast *in vivo* processes : from motile cilia to the beating heart

**Keywords :** Multiphoton microscopy, cellular cilia, beating heart, SHG

**Abstract :** Oscillations are abundant at every scale of the living world. In development biology, the beating heart and the motile cilium are two oscillators operating at temporally and spatially analogous scales. Their dynamic visualization is a major experimental challenge, which would shed new lights on the biological processes they are involved in. In this manuscript, we will extract their biophysical features or image their three-dimensional beating pattern *in vivo*, in a vertebrate model organism : the zebrafish. To circumvent current limitation in imaging speed, we will use the common periodic property of their motion to develop innovative strategies for fast multiphoton imaging. First, the cellular cilium is a cytoplasmic extension found in almost all eukaryotic cells whose role is to generate a biological flow when motile. In recent years, their dysfunctions have been identified to be involved in a growing number of pathologies, known as ciliopathies. In particular, they are present in large numbers in the zebrafish left-right organizer, the Kupffer vesicle : the directional flow they generate is responsible, at early stages, for the breaking of the left-right symmetry, the last biological axis to specify in vertebrates. In this manuscript, we will describe a system-

atic approach to extract cilia biophysical features, using the scanning artifacts observed in point scanning multiphoton microscopy when imaging their periodic beating. The systematic workflow we developed has enabled us to unveil the establishment of a novel form of asymmetry in the Kupffer's vesicle. Similarly, the study of the beating heart and the visualization of its rapid and three-dimensional periodic motion remains a challenge, even using state-of-the-art fluorescence microscopy techniques. In this work, we will propose a fast point-scanning imaging method that takes advantage of the periodic property of the beating heart. It relies on the retrospective synchronization of fast scanned line sequences. We will show how this approach can reach unprecedented temporal resolutions (in the order of 1000 volumes per second), with label-free contrast, and without compromising any other acquisition parameters, such as SNR or spatial resolution. In particular, we applied the method to the tracking of contracting cardiac sarcomeres *in vivo*, using second harmonic generation (SHG), and achieved reconstruction the 3D motion of the cardiac valves, the fastest-moving structure of the heart.

