



HAL
open science

Apprentissage machine pour l'imagerie microscopique quantitative sans marquage.Applications à l'imagerie biomédicale.

Guillaume Maucort

► **To cite this version:**

Guillaume Maucort. Apprentissage machine pour l'imagerie microscopique quantitative sans marquage.Applications à l'imagerie biomédicale.. Physique [physics]. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0287 . tel-03905960

HAL Id: tel-03905960

<https://theses.hal.science/tel-03905960v1>

Submitted on 19 Dec 2022

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ECOLE DOCTORALE SCIENCES PHYSIQUES ET
DE L'INGENIEUR

LASERS, MATIERE, NANOSCIENCES

Par Guillaume MAUCORT

Apprentissage machine pour l'imagerie microscopique
quantitative sans marquage.

Applications à l'imagerie biomédicale.

Sous la direction de : Pierre BON

Soutenue le 07 Novembre 2022

Président du jury : Manuel Rojo. Membres du jury :

M. David ROUSSEAU	Directeur de Recherche	Université d'Angers	Rapporteur
M. Sebastien POPOFF	Chargé de Recherche	ESPCI	Rapporteur
Mme. Perrine PAUL-GILLOTEAUX	Ingénieure de Recherche	Université de Nantes	Examinatrice
M. Manuel ROJO	Directeur de recherche	Université de Bordeaux	Examinateur
M. Daniel SAGE	Enseignant-chercheur	EPFL	Examinateur
M. Pierre BON	Chargé de Recherche	Université de Limoges	Directeur
M. Baudouin DENIS DE SENNEVILLE	Directeur de Recherche	Université de Bordeaux	Invité

Résumé

L'imagerie en microscopie optique linéaire est l'approche phare pour l'étude des échantillons biologiques vivants à haute résolution. En effet, elle peut être à la fois possiblement très faiblement invasive et permettre de d'observer des détails sub-microniques en profondeur. On peut distinguer deux familles de microscopie optique linéaire : l'imagerie utilisant des sondes (en général fluorescentes) et l'imagerie sans marquage. Si la première approche est la méthode de choix pour l'identification et le suivi d'espèces moléculaires, elle reste plus invasive que la deuxième avec une toxicité et une fragilité des sondes empêchant généralement l'imagerie sur le long terme. L'imagerie sans marquage permet d'imager de manière aspécifique la totalité des composants cellulaires, mais peine à obtenir une imagerie spécifique d'espèces moléculaires.

Le but de ma thèse était de développer une algorithmie adaptée à l'imagerie sans marquage pour (i) améliorer la discrimination entre deux composants cellulaires et (ii) démêler la quantité énorme d'information présentes dans une image pour la rendre spécifique sans pour autant avoir recours à des méthodes d'optique non-linéaires lentes et/ou nécessitant une importante fluence d'excitation.

Pour cela, nous avons eu recours à la microscopie de phase quantitative par interférométrie à décalage. Elle fournit une mesure conjointe de données (complexes) d'amplitude et de phase de la lumière de façon quantitative et à très haute sensibilité. J'ai donc adapté un modèle algorithmique de type U-Net pour prendre en compte des données d'entrée complexes, et modifié les différents éléments constitutifs de ce modèle pour la gestion de ce type de données.

L'utilisation complète du champ électromagnétique associée à une métrique adaptée dans une architecture U-Net sur données complexes, pour l'identification et le suivi notamment de la dynamique mitochondriale sans marquage montre des résultats clairement supérieurs à ceux obtenus avec l'utilisation des composantes d'intensité ou de phase seule, y compris pour des éléments intra-cellulaires diffus tels que le réticulum endoplasmique.

La prise en compte de l'intégralité du champ électromagnétique se révèle particulièrement intéressante pour les études d'échantillons en trois dimensions. En effet, les composantes d'intensité et de phase du champ électromagnétique portent des informations complémentaires en profondeur sur l'échantillon et fournissent des capacités de reconstruction précises dans le cas des mitochondries et prometteuses pour les éléments diffus.

Notre méthode robuste de prédiction de fluorescence permet également d'utiliser la refocalisation numérique offerte par des mesures de phase et d'intensité et ainsi permettre de créer un volume en trois dimensions à partir d'une acquisition en deux dimensions. Nous réalisons ainsi de l'imagerie spécifique computationnelle en trois dimensions sur de multiples marquages *in silico* à haute fréquence (limitée uniquement par la caméra) de manière complètement

non-invasive.

Abstract

Linear optical microscopy is the main imaging modality for living biological samples studies at high resolution. It presents a possibly very low invasivity coupled with the ability to observe sub-micron in-depth elements. We can distinguish two main linear optical microscopy families : imaging using probes (usually fluorescence probes) and label-free imaging. The first approach is the main one when it comes to identification and study of molecular species. However, it is more invasive than the latter. Both the inherent toxicity and probes fragility usually prevent long-term imaging. Label-free microscopy allows aspecific imaging of the entirety of cell components but lacks specificity when it comes to particular molecular species.

The goal of my thesis is to develop an algorithm adapted to label-free imaging in order to (i) improve the discrimination between two cellular elements and (ii) unravel the enormous amount of information within an image to make it specific without requiring slow non-linear optical methods and/or with high excitation fluence.

We used quantitative phase imaging using quadriwave lateral shearing interferometry to obtain very high sensistivity and quantitative measurements of joint light amplitude and phase complex data. We then adapted existing U-Net algorithm models in order to take complex-valued data as input, and modified the various components of this model to adapt them to these kind of data.

Using the electromagnetic field in addition to a custom loss function within a U-Net architecture, with complex-valued input data, for label-free identification and study, among others, of mitochondrial dynamics display clearly improved results compared to the ones obtained with the use of the intensity or phase components alone, even for diffuse intra-cellular elements such as the endoplasmic reticulum.

The use of the whole electromagnetic field is especially interesting when studying three-dimensional samples. The intensity and phase components of the electromagnetic field carry complementary in-depth informations about the sample and allows for precise reconstruction when it comes to mitochondria and promisiing results for the diffuse elements.

Our robust fluorecence prediction method also allows the use of numerical re-focusing provided by phase and intensity measurements. We can then recreate a three-dimensional volume from a two-dimensional acquisition. Therefore, we realize high frequency (only limited by camera acquisition) specific computational imagery in three dimensions in a completely non-invasive way.

It is impossible to live in the past,
difficult to live in the present and
a waste to live in the future.

Frank Herbert
Dune

Remerciements

Ces trois années de thèse à Bordeaux s'achèvent, et viennent mettre fin à un cycle démarré il y a maintenant 13 ans, alors que fraîchement diplômé et pleins d'idéaux et d'envies d'explorations, je démarrais un doctorat à l'autre bout du monde. Il m'aura donc fallu un poil plus de temps que la normale pour compléter cette étape à cheval entre fin de formation et début de carrière. Dire que le chemin pour arriver ici fut rude et mouvementé relève de l'euphémisme. De nombreuses personnes ont été à mes côtés tout au long de ces années et ces quelques lignes leur sont dédiées.

Mon premier et principal remerciement est pour Pierre Bon, qui a été un formidable directeur de thèse au cours de ces trois années. Merci à toi de m'avoir donné cette chance de réaliser un projet de recherche sur un sujet qu'aucun de nous deux ne maîtrisait au début (c'est d'ailleurs encore discutable) et qui sert désormais de fondation. Tu as compris rapidement ce que tu pouvais attendre de moi, compris mes forces et accepté mes limitations et manques d'efforts récurrents, et nous avons pu ainsi avancer en collaboration, plus qu'en direction. Ta passion pour la science et ta bonne humeur sont contagieuses, et je suis honoré d'avoir été membre de ton équipe. Merci enfin et surtout d'être depuis maintenant de nombreuses années un ami précieux avec qui la transition entre relation personnelle et professionnelle est possible à haute fréquence sans accroc.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble de la communauté des microscopistes et acteurs de l'imagerie biologique. Les rencontrer et échanger avec eux, notamment à Mifobio est une chance et un plaisir de chaque instant. C'est avec grand plaisir que je vais intégrer cette communauté et je compte m'y investir du mieux que je peux. Je remercie en particulier David Rousseau, Perrine Paul-Gilloteaux et Daniel Sage qui n'ont pas hésité à répondre favorablement à ma demande de participation à mon jury de thèse lors de notre rencontre à Mifobio. Merci également à Baudouin Denis De Senneville d'avoir accepté de participer sans me connaître (merci P.Bon d'ouvrir autant de portes dans cette communauté). Merci à Manuel Rojo pour les échanges collaboratifs sur les applications pour les mitochondries, je regrette de ne pas avoir pu faire plus d'applicatif. Merci enfin à Sebastien Popoff pour son code sur les fonctions de deep complexe qui ont servi d'épine dorsale à mes développements et qui complètera à merveille ce jury pluridisciplinaire.

Merci à l'ensemble du personnel du LP2N pour leur accueil au cours de ces trois années ainsi que pour leurs efforts pour que mon handicap ne soit pas un frein à mon activité au sein du laboratoire. Merci à Laurent Cognet pour son accueil au sein de son équipe élargie. Merci Alberto pour les petites remarques piquantes mais toujours justes et Chau pour ta bonne humeur et ta disponibilité, la petite équipe un peu bancal que l'on a constituée a fonctionné plutôt bien. Merci à Anthony, Chiara et Karen pour les différentes discussions au fil des années. Un mot également pour l'équipe Nasso, avec qui j'ai pu développer une certaine proximité, pas seulement géographique. Merci Pierre pour

tes conseils et interventions, rares mais toujours justes jusque dans le troll. Amaury, Naveen et Aurelien, merci pour vos discussions toujours intéressantes et drôles. A bientôt Amaël pour une nouvelle partie. Merci à Camille pour ta bonne humeur et ton enthousiasme constant, c'est un plaisir de te côtoyer au quotidien.

Le passage dans ce labo m'aura aussi permis d'établir une proximité toute particulière et une amitié sincère avec quelques personnes. Adeline, un grand merci pour ton accueil et ta disponibilité à écouter mes états d'âme (et accessoirement à livrer les tiens en long en large et en travers). Prendre mon café du matin à tes côtés va me manquer. Merci beaucoup à mes deux compères des apéros tardifs en période de couvre-feu. Vous n'avez pas idée à quel point ces moments de partage ont été primordiaux dans le maintien de mon moral alors qu'on n'avait clairement pas des vies faciles. Gaëlle, merci pour les discussions toujours engagées avec des positions franches et des blagues. Ces débats sont les meilleurs à avoir autour d'une bonne bouteille. Merci enfin à Laetitia pour ta douceur, ta bienveillance et ta franchise. Je crois que j'aime tout simplement passer du temps avec toi, le reste n'a que peu d'importance.

Cette thèse ne se serait pas aussi bien déroulée si je n'avais pas eu un petit entraînement il y a quelques années. Les personnes rencontrées à l'Université du Queensland lors de ma première thèse avortée m'ont amené énormément autant sur le plan scientifique qu'humain. Merci donc à Halina Rubinsztein-Dunlop pour m'avoir donné l'opportunité de la rejoindre en stage puis en thèse. Dans une carrière, et dans la vie en général, il faut des modèles et des personnes à admirer. Vous l'avez clairement été pour moi, humainement et scientifiquement. Merci à Fred Meunier d'avoir accueilli un physicien dans son labo de biologie pour avoir une autre vision de ses problématiques. "Je fais des recherches sur ce qui m'éclate", cet état d'esprit me colle à la peau depuis nos échanges. Merci également de m'avoir fait prendre conscience de mon envie profonde d'être un physicien/informaticien qui bosse pour des bios. Une petite pensée pour les autres membres côtoyés là-bas, *her doktor* Robert Vogel, Prof. Norm Heckenberg qui était un puits de science littéral, Timo pour son accueil et les repas philosophiques, Paul et Vincent pour leur amitié.

Dans la liste des gens sans qui je ne serai pas ici en train de faire ces remerciements se trouvent l'ensemble des médecins et personnels soignants que j'ai eu à côtoyer au cours de l'année et demie (en tout, à la louche) que j'ai passée dans des hôpitaux, qu'ils soient à Bordeaux, Paris, Charleville ou Brisbane, et tout particulièrement ceux ayant refusé de baisser les bras une sombre nuit de Septembre 2011. A vous tous que j'ai croisé ou que je ne croiserai jamais, merci de votre dévouement.

Citons maintenant pêle-mêle quelques personnes ou entités m'ayant accompagné au cours de ces trois années et dont l'impact a été suffisant pour se retrouver dans ces lignes. Devin Townsend et sa folie créatrice, Alexclick et Miguel, la chaîne *wherepostrockdwells* et les dizaines d'heures d'écoute, Wanda, le studio Fortiche et leur chef d'oeuvre, Denis Villeneuve pour avoir enfin rendu l'hom-

mage nécessaire à ce monument qu'est Dune, Thinkerview pour leur capacité à me faire réfléchir sur des sujets tout aussi pointus que variés, les Anonymous poker avec qui j'ai partagé de beaux moments, Alain Damasio, Yoshihiro Togashi, Cassandra, Neil Gaiman et tant d'autres...

Merci également à toute l'équipe des copains parisiens que je vois malheureusement trop peu souvent. Nico, tu me manques énormément et je ne saurais jamais assez te remercier pour les efforts que tu fais avec moi. So pour les grandes discussions profondes et engagées. Julia et Edouard, avec qui j'ai tellement en commun et avec qui les années sont comme des jours. Adrien, l'amour vache, c'est quand même de l'amour. Clément, parce qu'une murge avec toi, c'est une murge réussie. Et aux autres anciens supops et pièces rapportées, que je recroise toujours avec autant de plaisir. Dorian et Angie, vous êtes des amis précieux.

Merci enfin aux membres de ma famille qui m'ont accompagné et soutenu depuis si longtemps. A Maman et Papa, je n'ai pas de mots assez forts ou assez juste pour décrire la reconnaissance que j'ai pour l'accompagnement que je reçois depuis si longtemps. A Chloé, qui a finalement été docteur avant moi, je n'ai que de l'admiration pour la personne que tu es. Bientôt les docteurs Pikeurs. Merci Quentin pour l'ensemble des moments partagés au cours de ces trois années, que ce soit autour d'une bière et d'un jeu ou d'un match ou par micro interposé. Merci à David et Coralie, pour les échanges et les franches rigolades. Merci à Nathalie, Mamée, Ophélie, Sylvain, Vanessa, Liliane, Camille, Seb et Sonia, et tous les autres. Et merci à toi, qui va bientôt partir, pour l'amour que tu as pu donner à tes petits enfants depuis tout ce temps.

A tous ceux que j'ai pu oublier, et aux autres qui ne le méritent pas.

In the pursuit of great,
we failed to do good

Viktor
Arcane

Table des matières

1	Introduction	1
2	État des lieux	5
2.1	Biologie cellulaire	5
2.1.1	Éléments cellulaires	5
2.1.2	Mitochondries	6
2.1.3	Réticulum endoplasmique	8
2.1.4	Observation cellulaire	9
2.2	Microscopie de fluorescence	15
2.2.1	Marquage de fluorescence	16
2.2.2	Principaux systèmes	17
2.2.3	Synthèse critique	22
2.3	Microscopie sans marquage	24
2.3.1	Principaux concepts	24
2.3.2	Microscopie en champ sombre	24
2.3.3	Microscopie en lumière polarisée	25
2.3.4	Microscopie à contraste de phase	26
2.3.5	Microscopie de phase quantitative	29
2.3.6	Synthèse critique	34
2.4	Apprentissage profond pour la segmentation	36
2.4.1	Réseaux de neurones convolutifs	38
2.4.2	Réseaux U-net	39
2.4.3	Synthèse critique	41
2.5	Objectifs de la thèse	42
3	Deep learning sur données complexes	45
3.1	Acquisition des données	45
3.1.1	Montage expérimental	45
3.1.2	Type de données	47
3.1.3	Échantillons biologiques	51
3.2	Appropriation du U-net	54
3.2.1	Modèle initial	54
3.2.2	Fonctionnement du modèle	57
3.2.3	Application à la segmentation de mitochondries depuis une image de phase	66

3.3	Utilisation de la donnée complexe	68
3.3.1	Intérêt de la donnée complexe	68
3.3.2	Évolution des blocs du modèle	68
3.3.3	Métriques d'apprentissage	71
3.3.4	Caractérisation	74
3.3.5	Conclusion	77
3.4	Résultats	78
3.4.1	Segmentation de mitochondries	78
3.4.2	Comparaison entre différents modèles	81
3.4.3	Réticulum endoplasmique	87
3.5	Analyse critique de l'évolution	89
4	Etude volumique	93
4.1	Informations 3D	94
4.2	U-net 3D	96
4.2.1	Évolution du modèle	96
4.2.2	Limitations	97
4.2.3	Conclusion	97
4.3	Expériences 3D	99
4.3.1	Acquisitions 3D	99
4.3.2	Résultats	101
4.3.3	Déconvolution des piles 3D	110
4.3.4	Prédictions sur données déconvoluées	113
4.4	Propagation numérique	117
4.4.1	Théorie	117
4.4.2	Analyse de propagation	118
4.5	Applications de la propagation numérique	125
4.5.1	Prédiction volumique depuis une acquisition 2D	125
4.5.2	Conclusions	129
4.6	Analyse critique et perspectives	131
5	Conclusions et perspectives	133
5.1	Avancées réalisées	133
5.1.1	Évolutions technologiques	133
5.1.2	Régénération d'éléments biologiques	136
5.1.3	Analyse critique	140
5.2	Perspectives	141
5.2.1	Évolutions techniques	141
5.2.2	Applications	144

Chapitre 1

Introduction

Contexte général

L'homme a toujours cherché à comprendre le fonctionnement du vivant, en particulier le sien, et y a consacré des domaines entiers de recherche. Ces études sont motivées, outre le besoin de compréhension, par une volonté de faire avancer la médecine et d'améliorer l'expérience de vie humaine. La compréhension des causes et la recherche de remèdes aux maladies, vieillissement ou autres dysfonctionnements du corps humain sont au coeur des recherches biologiques et médicales.

La biologie s'est, au fil du temps, dotée d'outils qu'elle a été chercher dans les domaines scientifiques voisins. Le développement de la physique et de l'optique ont permis l'accès, *via* l'utilisation de microscopes, à une échelle de vision inaccessible pour la vision humaine. Ce développement interdisciplinaire a vu l'émergence de la biologie cellulaire puis, dans un second temps, moléculaire. Les avancées dans les recherches biologiques ont ainsi été intimement liées aux avancées dans les techniques et outils d'imagerie. Depuis quelques décennies, un nouveau domaine de recherche a pris de plus en plus de place : l'informatique. L'utilisation d'outils informatiques a également permis des progressions conséquentes dans la recherche sur le vivant avec les développements de l'automatisation et de techniques de traitement du signal de plus en plus poussées.

De nombreux développements et recherches sont désormais à l'interface entre ces trois grands domaines : la biologie, la physique et l'informatique. La collaboration d'experts de ces domaines respectifs ainsi que de personnes capables de les articuler est souvent primordiale à la réussite des études et recherches. Nous possédons dans notre équipe de recherche de fortes compétences en optique et développement ainsi qu'une appétence à la compréhension des problématiques biologiques. Notre travail est effectué en collaboration avec des biologistes cellulaires afin d'obtenir une complémentarité de compétences pour mener à bien ces travaux complexes.

Cadre des travaux thèse

L'utilisation de techniques de microscopie de plus en plus poussées s'est démocratisée et l'accès à des échelles de plus en plus fines avec des résolutions élevées est devenu possible. Cependant il est nécessaire de faire des compromis entre, notamment, échelle de l'observation, résolution des images, spécificité des éléments observés d'une part et toxicité (chimique et optique), possibilité d'imager des éléments vivants, durée et fréquence maximale d'acquisition d'autre part.

En particulier, les méthodes permettant d'observer des éléments à l'échelle nanométrique ne vont, par exemple, fonctionner que sur des échantillons fixés et vont demander des temps d'acquisition et de préparation très longs. De l'autre côté, des techniques d'imagerie optique en lumière blanche sont très peu invasives et ne requièrent quasiment aucune préparation : elles permettent ainsi des acquisitions longues sur des éléments vivants mais sont très peu spécifiques et ont une résolution et un contraste limités. Plusieurs techniques intermédiaires faisant des compromis adaptés à l'objectif à atteindre existent entre ces deux extrêmes et les recherches visant à s'affranchir de certaines de ces limitations sont nombreuses.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de cette thèse. En effet, l'objectif est d'utiliser des moyens computationnels, par le biais d'algorithmes d'apprentissage profond et de traitement avancé des données de microscopie, imagerie de fluorescence et imagerie en lumière blanche, afin de combiner deux techniques de microscopie et de conserver leurs avantages respectifs. Mon objectif est de pouvoir retrouver des éléments intra-cellulaires et un signal tel que fourni par la microscopie de fluorescence à partir d'images de microscopie quantitative de phase. Le passage par l'apprentissage profond permet de revoir le compromis réalisé entre invasivité, toxicité, résolution d'imagerie ainsi que temps d'acquisition et de pouvoir réaliser de l'imagerie vivante spécifique sans marquage en trois dimensions dans le temps.

Déroulé du récit

Dans ce mémoire, je décrirai dans un premier temps le point de départ de mes travaux, en adressant le contexte des études de biologie cellulaire. Je dresserai également un état des lieux des différentes techniques d'imagerie permettant l'accès à la visualisation et l'étude des cellules. Je m'arrêterai particulièrement sur les techniques de microscopie optiques de fluorescence et de microscopie sans marquage dont sont issues les modalités d'études utilisées dans mes travaux. Je décrirai les différents compromis inhérents à ces différentes méthodes et les choix que nous avons réalisés pour privilégier la microscopie de fluorescence en champ large et la microscopie par interférométrie à décalage quadrilatéral. Je mentionnerai enfin les avancées réalisées récemment sur les techniques d'apprentissage profond, en particulier appliqué à des tâches de segmentation. De ces constats émergera un plan afin d'utiliser de tels modèles informatiques pour combiner les deux modalités de microscopie qui nous intéressent particu-

lièrement afin de répondre à des problématiques biologiques de segmentation d'éléments intra-cellulaires, en particulier les mitochondries.

Dans la seconde partie de cette thèse, je décrirai en détail les mécanismes de fonctionnement des modèles d'apprentissage profond U-Net, particulièrement adaptés à la segmentation d'images. Je mettrai également en évidence les modifications que j'y ai apportées afin de les appliquer aux mieux aux problématiques et modalités qui nous sont propres, à savoir l'utilisation de données issues de microscopie quantitative de phase. L'évolution de ces algorithmes et leur capacité à prendre correctement en compte les données particulières de notre microscopie de phase donnant accès au champ électromagnétique complexe constitue l'une des principales avancées de mes travaux.

Le passage en trois dimensions à des études volumiques sera l'objet de la troisième partie de ce manuscrit. Même si le passage en trois dimensions est assez direct d'un point de vue algorithmique, il est primordial pour l'étude d'échantillons biologiques vivants. Nous décrirons les résultats obtenus par ces adaptations sur des mesures de microscopie en quatre dimensions, les trois dimensions spatiales et le temps. L'utilisation des propriétés physiques obtenues par mesure conjointe de l'intensité et de la phase nous permettant la reconstruction numérique de piles d'images en profondeur à partir d'une simple acquisition en deux dimensions, nous discuterons de la possibilité d'obtenir des informations de segmentation en trois dimensions de fluorescence à partir d'acquisitions d'images de phase et d'intensité en deux dimensions.

Enfin, comme les travaux de cette thèse sont fondateurs dans le développement de ces outils de calcul et de prédiction de segmentation, je m'attacherai à ouvrir des perspectives pour les futurs développements et améliorations de cet outil. Je reviendrai également sur les principales applications biologiques en cours et potentielles pouvant découler de l'implémentation de ce nouvel outil.

Chapitre 2

État des lieux

2.1 Biologie cellulaire

L'étude du vivant, à l'échelle de la cellule, du point de vue structural ou fonctionnel est appelée biologie cellulaire, est un domaines de recherche fondamentale primordial. En effet, la cellule étant l'unité biologique fondamentale à tous les êtres vivants (MAZZARELLO, 1999), la compréhension de son fonctionnement est à la base de l'étude biologique. En particulier, les eucaryotes (WHITTAKER, 1978), (CAVALIER-SMITH, 1986) possédant un système interne complexe avec un noyau délimité par une membrane interne et de nombreux organites, sont la base entre autres des animaux et donc de l'homme. La compréhension de la structuration ainsi que des mécanismes régissant le fonctionnement cellulaire est nécessaire pour appréhender le fonctionnement, et comprendre les raisons de dysfonctionnement le cas échéant.

Je détaillerai dans ce chapitre les différents éléments constituant les cellules, avec un intérêt tout particulier pour les mitochondries qui sont notre principal sujet d'étude ainsi que le réticulum endoplasmique. J'évoquerai aussi les grandes familles d'imagerie du vivant afin d'appuyer les choix de techniques que nous avons faits dans l'objectif d'imager et segmenter ces organelles en trois dimensions au cours du temps avec le moins d'invasivité possible.

2.1.1 Éléments cellulaires

Au sein d'un organisme pluricellulaire comme l'organisme humain, environ 10^{13} à 10^{15} cellules sont associées pour former des tissus et des organes. L'organisme humain comporte plus de 200 types cellulaires distincts. Ces cellules dérivent toutes d'une unique cellule initiale, mais leurs structures sont spécialisées en vue de fonctions précises au sein de l'organisme. Ces cellules sont totalement dépendantes du bon fonctionnement des autres cellules. Ce fractionnement des fonctions au sein de l'organisme pluricellulaire nécessite une coordination entre cellules et donc des systèmes de communication.

La cellule eucaryote est le type de cellule dont la taille est la plus grande (2

à $100\mu m$). Ses éléments sont représentés sur la figure 2.1. Elle est limitée par une membrane biologique appelée membrane plasmique qui la sépare de son environnement et assure les échanges avec l'extérieur. L'intérieur de la cellule est compartimenté par des systèmes membranaires qui définissent différents types d'organites. Le noyau, séparé du reste de la cellule, est un des éléments majeurs de la cellule, puisqu'il est le lieu de stockage et de réplication de l'ADN et de transcription et maturation des ARN.

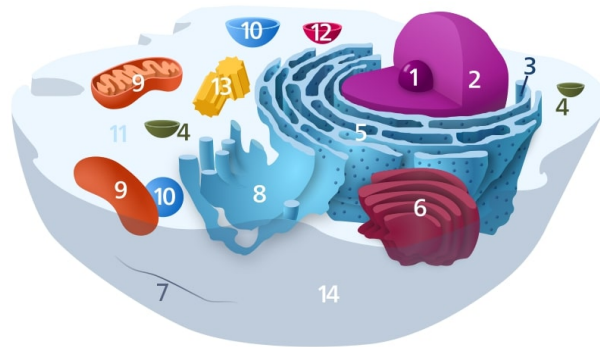


FIGURE 2.1 – Représentation schématique d'une cellule animale. Les éléments composant la cellule sont le nucléole (1), le noyau (2), les ribosomes (3), des vésicules (4), le réticulum endoplasmique rugueux (5), l'appareil de Golgi (6), le cytosquelette (7), le réticulum endoplasmique lisse (8), les mitochondries (9), les peroxyosomes (10), le cytosol (11), les lysosomes (12), le centrosome (13) et la membrane plasmique(14). Image libre tirée de Wikipédia.

Le cytosol représente un ensemble complexe compartimenté en organites, structuré par le cytosquelette. De nombreuses réactions du métabolisme s'y déroulent. Un vaste réseau membranaire, le réticulum endoplasmique, impliqué dans les fonctions de synthèse et de transport s'y ramifie. On distingue le réticulum endoplasmique lisse et le réticulum endoplasmique granulaire où les membranes sont associées aux ribosomes, qui jouent un rôle essentiel dans la synthèse des protéines. L'appareil de Golgi forme un second réseau intracytoplasmique qui participe aussi à diverses activités de synthèse, de transport, de transformation et de triage. De petites vésicules membranaires, les lysosomes exercent leur fonction dans la digestion cellulaire. D'autres vésicules membranaires, les peroxyosomes, contiennent des enzymes permettant l'oxydation de nombreuses molécules organiques. Les mitochondries sont le siège des phénomènes de la respiration cellulaire, nécessaire à l'accomplissement des diverses fonctions métaboliques.

Je vais maintenant décrire plus en détail deux organelles que nous avons particulièrement étudiées pendant ma thèse, les mitochondries et le réticulum endoplasmique.

2.1.2 Mitochondries

Bien que l'ensemble des éléments soient nécessaires au bon fonctionnement des mécanismes cellulaires, certains ont des rôles plus critiques que d'autres. C'est le cas notamment des mitochondries (TZAGOLOFF, 1982) (Figure 2.2). En effet,

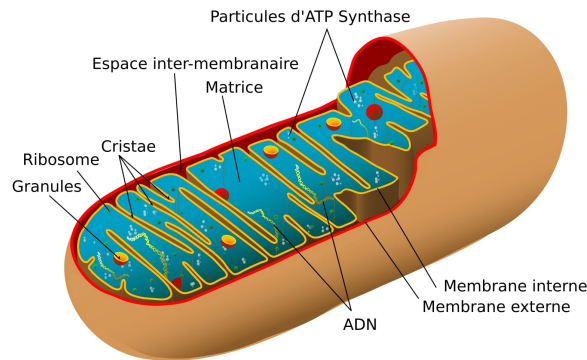


FIGURE 2.2 – Représentation schématique d'une mitochondrie animale. Image libre tirée de Wikipédia.

elles tiennent le rôle de "centrale énergétique" des cellules en étant la principale source de synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) (Figure 2.3) via le mécanisme de phosphorylation oxydative (MITCHELL, 1961), (DAHOUT-GONZALEZ, 2006). La création d'ATP à partir des molécules issues de la digestion (glucose) est la dernière étape du cycle respiratoire de la cellule (cycle de Krebs) (RICH, 2003). L'ATP est une molécule qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme, à la locomotion, à la division cellulaire et au transport actif d'éléments chimiques à travers les membranes. Les mitochondries ont également un rôle dans de nombreuses étapes du cycle cellulaire, telles que la différenciation, la communication ou encore l'apoptose (MCBRIDE, 2006). Les mitochondries ont un diamètre allant de $0.75\mu m$ à $3\mu m$ et une longueur pouvant atteindre $10\mu m$ et varient grandement en taille et structure.

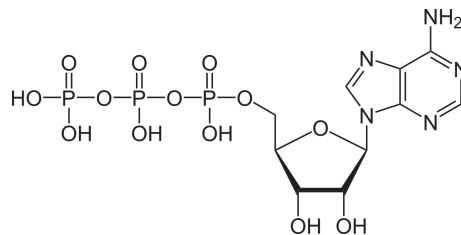


FIGURE 2.3 – Structure de l'adénosine triphosphate (ATP).

Le dysfonctionnement des mitochondries peut induire des maladies très diverses pouvant être retrouvées autant chez l'enfant que l'adulte dans l'ensemble des spécialités médicales. On notera en particulier des maladies neurologiques générées ou aggravées par des dysfonctionnements mitochondriaux telles que certaines myopathies, des maladies neurodégénératives ou encore l'autisme (ROSE, 2016), (BRAND, 2011). Des mutations de l'ADN mitochondrial sont également relevées dans l'étude des maladies de Parkinson et Alzheimer (SCHAPIRA, 2006), (LEGROS, 2004) et peuvent également être à l'origine de cancers (WALLACE, 2012).

L'observation et la compréhension des dynamiques mitochondriales est donc un champ de recherche très important et étendu. En effet, ces dynamiques sont mal connues et pourraient être liées au vieillissement naturel mais également reliées à l'apparition de maladies dégénératives telles que la maladie de Charcot. Nous avons donc décidé de collaborer avec l'équipe *Bioénergétique et dynamique des mitochondries* d'Arnaud Mourier dont l'un des principaux axes de recherche est la compréhension des mécanismes contrôlant la fusion et fission mitochondriales et le développement d'outils *in vivo* de quantification de ces processus.

2.1.3 Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) (PALADE, 1956) est un organite lié à la membrane nucléaire (Figure 2.4). Il sert principalement de système de transport intra-cellulaire via des vésicules. Il synthétise également les protéines, produit des macromolécules et transfère des substances vers l'appareil de Golgi. C'est une organelle composée de deux éléments distincts, le réticulum endoplasmique rugueux et le réticulum endoplasmique lisse, qui ont des fonctions distinctes mais travaillent également ensemble pour traiter et distribuer des molécules à d'autres organites dans la cellule et pour exporter des molécules à l'extérieur de la cellule. La structure du réticulum endoplasmique est un système de cavités de forme irrégulière, de vésicules ou de tubules délimités par des membranes. Ces membranes ont une épaisseur allant de 5 à 6 nm et la structure du réticulum s'étend dans toute la cellule.

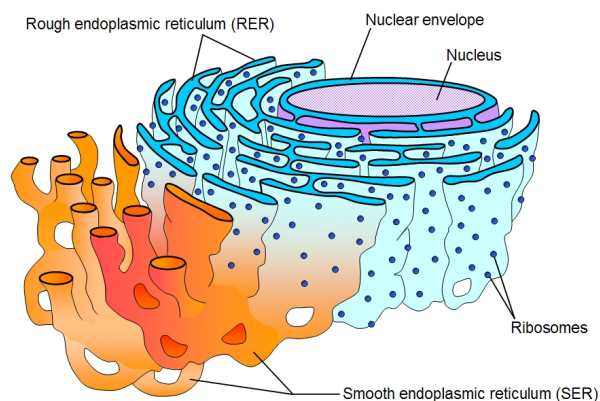


FIGURE 2.4 – Représentation schématique du réticulum endoplasmique et de sa disposition dans une cellule. Image tirée de cronodon.com.

La membrane mitochondriale externe peut s'associer au réticulum endoplasmique en une structure appelée *mitochondria-associated ER-membrane*¹ (MAM) (RIZZUTO, 2004), (LYSAKOWSKI, 1999). Cette structure joue un rôle important dans certaines voies de signalisation cellulaire du calcium et intervient dans le transfert de lipides entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries (HAYASHI, 2009), (GERMAIN, 2005). Ainsi, obtenir des informations

1. Pas de traduction française à notre connaissance

de co-localisation des mitochondries et du réticulum endoplasmique présente un grand intérêt dans la compréhension des dynamiques intra-cellulaires.

2.1.4 Observation cellulaire

De nombreux moyens d'imagerie d'échantillons biologiques ont été développés au cours du temps afin d'essayer de comprendre le fonctionnement et le cas échéant déceler et comprendre des dysfonctionnements du vivant. Les principales différences entre les moyens d'imagerie actuellement disponibles reposent sur la taille des éléments observés (de quelques microns à des dizaines de centimètres), la résolution des images (pouvant aller jusqu'à quelques nanomètres) et l'invasivité des moyens d'imagerie employés (pouvant aller jusqu'à la mort de la cellule ou du tissu *via* fixation).

Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique, usuellement appelée IRM, est une technique permettant d'obtenir des images de l'intérieur du corps de façon non invasive. Le principe est d'utiliser un champ magnétique puissant pour faire résonner les atomes d'hydrogène contenus dans les cellules et les tissus (LAUTERBUR, 1973). En appliquant des champs magnétiques non-uniformes, on arrive à localiser précisément dans l'espace l'origine de ces résonances. Une reconstruction en trois dimensions est possible avec l'acquisition de plans multiples.

Les principales applications de l'IRM concernent l'imagerie du cerveau (2.5) et la détection d'anomalies du système nerveux central telles qu'Alzheimer (SADEK, 2013), l'analyse de la structure et du fonctionnement cardiaque (PETERSEN, 2017) ou encore l'angiographie grâce à l'injection d'un marqueur (HARTUNG, 2011).



FIGURE 2.5 – Imagerie à résonance magnétique d'une section de cerveau mettant en lumière les structures sous-corticales. Image réalisée à l'université Johns Hopkins.

Il existe des techniques d'acquisition IRM pour l'analyse des évolutions au cours du temps. On notera par exemple l'utilisation de la technique d'imagerie par résonance magnétique rapide à faible angle (UECKER, 2010) permettant l'acquisition d'images à 50Hz avec une résolution spatiale de quelques millimètres. L'imagerie au cours du temps peut également permettre l'utilisation

d'ultrasons pour des ablations ciblées (CLINE, 1992). L'IRM peut également être utilisé pour le suivi de variations de températures (DENIS DE SENNEVILLE, 2005).

Cette technique est peu invasive et permet l'imagerie *in vivo* d'organes complets du corps humain. C'est l'un des outils principaux de diagnostic médical en hôpital. Bien que certaines utilisations permettent d'obtenir de bonnes résolutions temporelles, l'acquisition est longue, pénible pour le sujet et nécessite un équipement très lourd. Cette technique est extrêmement friande des techniques d'analyse du signal et d'apprentissage machine pour accélérer l'acquisition en réduisant le nombre d'angles (MONTALT-TORDERA, 2021) ainsi que pour réduire les artefacts dus au mouvement (SENNEVILLE, 2007). De plus, cette technique est adaptée à l'imagerie d'organes complets contrairement à l'imagerie au niveau microscopique que nous recherchons.

Microscopie électronique

La microscopie électronique utilise un faisceau d'électrons accélérés comme source d'illumination. On peut soit imager le contenu d'un échantillon ultra-fin (moins de $100nm$) avec la microscopie électronique à transmission soit la surface avec un microscope électronique à balayage. Afin d'éviter toute perturbation liée au passage du faisceau d'électrons dans l'air, les mesures se font sous vide. L'échantillon est donc nécessairement fixé. L'imagerie en transmission permet de distinguer les structures fines des tissus 2.6 avec une grande résolution. Des images en trois dimensions peuvent être obtenues par le biais de multiples coupes imagées les unes après les autres puis combinées pour reconstruire le volume.

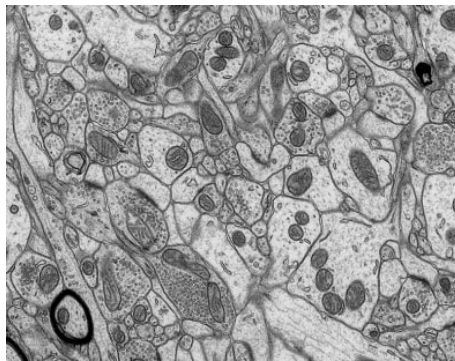


FIGURE 2.6 – Image de microscopie électronique à transmission de tissu du cerveau. Image tirée de la banque d'images de l'EPFL.

L'utilisation de microscope à balayage permet d'imager très finement la surface d'objets 2.7. Comme nous désirons étudier des éléments intra-cellulaires, cette technique n'est pas adaptée.

Le principal avantage de la microscopie électronique est la grande résolution grâce à l'utilisation d'une longueur d'onde d'illumination très petite. On peut ainsi atteindre des résolutions de $50pm$ (ERNI, 2009). Cependant lorsque l'on

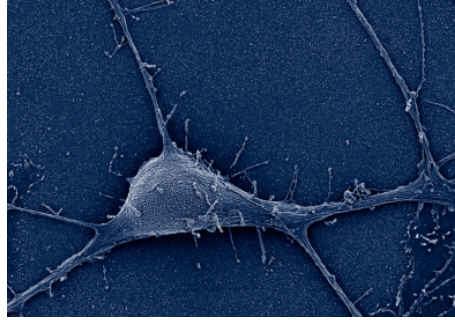


FIGURE 2.7 – Image de microscopie électronique à balayage d'un neurone. Image tirée de la banque d'images de l'EPFL.

souhaite étudier des échantillons biologiques, ils nécessitent d'être préparés et stabilisés en sections ultra-fines et marqués pour augmenter leur contraste. On peut également les fixer par le froid (FLORIAN, 2016) ou les vitrifier (SABANAY, 1991). Dans tous les cas ces préparations retirent l'aspect *in vivo* des échantillons et empêchent par nature l'imagerie temporelle que nous souhaitons atteindre.

Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique utilise une sonde locale qui se déplace sur un échantillon et dont les déplacements permettent de modéliser la topographie d'un échantillon (BINNIG, 1986). On vient ainsi analyser la surface de l'échantillon point par point et ainsi accomplir des mesures de forces, de l'imagerie topographique ou manipuler l'échantillon. Son principe de fonctionnement est représenté sur la figure 2.8. Les variations de hauteur de la pointe au passage sur des variations de l'échantillon sont mesurées.

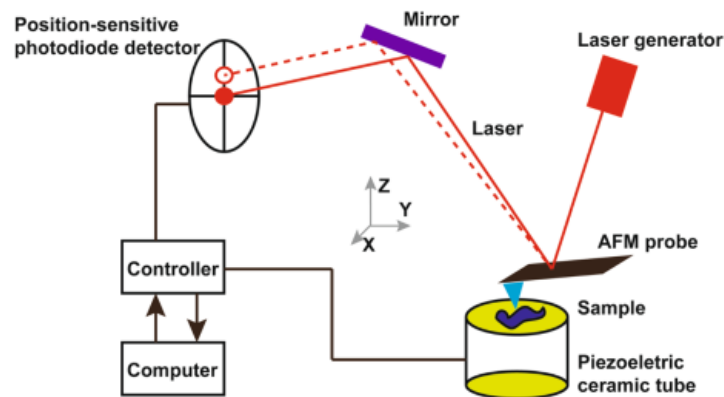


FIGURE 2.8 – Représentation schématique d'un microscope à force atomique. Image tirée de (DENG, 2018).

La microscopie à force atomique est appliquée en biologie au niveau moléculaire afin d'étudier la structure et les propriétés mécaniques tels que les microtubules (HAMON, 2010) ou l'appareil de Golgi (H. XU, 2013) (Figure 2.9). A l'échelle cellulaire, elle peut être utilisée pour mesurer des différences de dureté entre

cellules cancéreuses et saines (DENG, 2018). A noter également l'étude *in vitro* de l'ADN et de ses interactions avec les protéines (MURUGESAPILLAI, 2014).

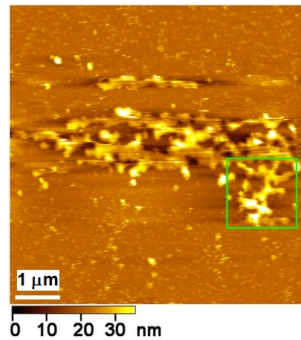


FIGURE 2.9 – Image par microscope à force atomique d'une partie de l'appareil de Golgi isolé de cellule HeLa. Image tirée de (H. XU, 2013).

La microscopie à force atomique permet d'atteindre des résolutions, dans la direction où la pointe oscille, allant jusqu'à la fraction du nanomètre (1000 fois mieux que la limite de diffraction optique). Cependant elle ne permet d'étudier que les surfaces au même titre que la microscopie électronique à balayage. Elle a cependant l'avantage de produire un profil de surface en trois dimensions et non une projection. De plus, aucune préparation particulière n'est requise pour la mesure. Elle est néanmoins limitée par la taille de la zone étudiée, le temps d'acquisition et son potentiel d'invasivité sur objets vivants.

Imagerie photoacoustique

L'imagerie photoacoustique, aussi appelée imagerie optoacoustique ou thermoacoustique utilise la mesure d'ultrasons produits par l'absorption par un tissu d'énergie électromagnétique, usuellement des impulsions laser (M. XU, 2006). Comme cette absorption est directement liée aux propriétés physiologiques, l'amplitude de l'émission d'ultrasons sera directement proportionnelle à la quantité d'énergie transférée. On peut ainsi détecter les contrastes d'absorption et calculer des images 2D ou 3D de saturation en oxygène de tissus (GRINVALD, 1986), de vaisseaux sanguins (L. V. WANG, 2012) ou encore détecter des lésions du cerveau (X. WANG, 2003). L'absorption plus importante des micro-ondes par les tissus mammaires malins permet également l'imagerie du développement de tumeurs (KU, 2005). Les principales réalisations de montages photoacoustiques sont représentés sur la figure 2.10.

Ce type d'imagerie permet l'accès à des informations *in vivo* sur des tissus et organes complets. Cette technique nécessite néanmoins l'utilisation d'impulsions laser à différentes fréquences et longueur d'ondes. Elle nécessite également de cibler des tissus ou éléments présentant des différences d'absorption. Cependant, les ondes acoustiques étant bien mieux propagées que les ondes optiques dans les tissus, on peut atteindre des profondeurs plus grandes que pour l'imagerie optique traditionnelle. Cela reste cependant complexe d'atteindre les résolutions sub-cellulaires nécessaires pour l'étude des organelles.

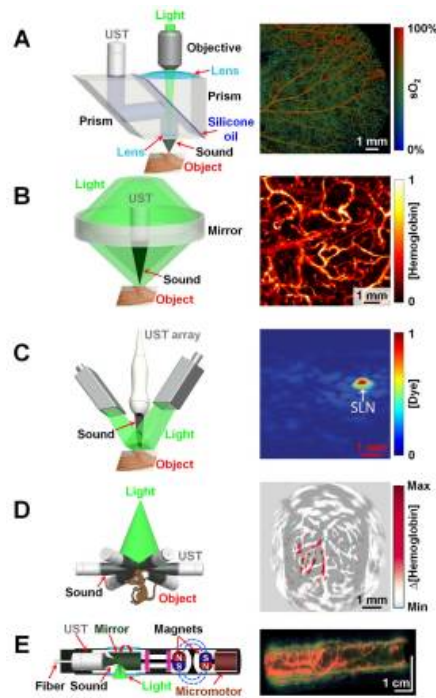


Figure 2.10 – Principaux systèmes photoacoustiques et images in vivo associées. Mesure de la saturation en oxygène d'une oreille de souris par microscopie photoacoustique à résolution optique (A). Concentration d'hémoglobine normalisée dans une paume humaine par microscopie photoacoustique à résolution acoustique (B). Concentration normalisée en bleu de méthylène dans un ganglion lymphatique de rat par tomographie photoacoustique (C). Changements hémodynamiques du cerveau par tomographie photoacoustique (D). Oesophage de lapin par endoscopie photoacoustique (E). Figure tirée de L. V. WANG, 2012.

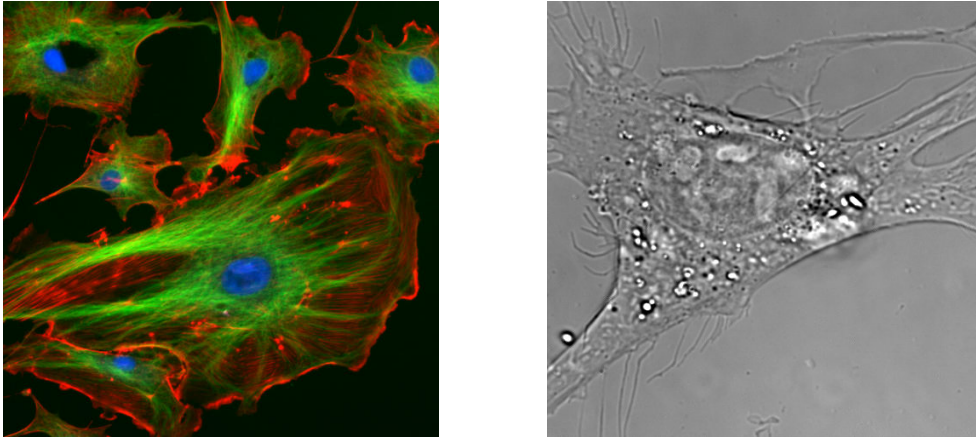
Microscopie optique

La microscopie optique utilise la combinaison de lumière allant de l'ultraviolet à l'infrarouge et d'un système de lentilles afin de générer des images agrandies de petits objets. La lumière passe à travers ou est réfléchi par l'échantillon observé et est ensuite collectée par un système optique puis envoyée vers un capteur, humain dans le cas de l'oeil ou électronique pour des caméras ou détecteurs.

Il existe de nombreuses techniques de microscopie optique utilisées afin d'augmenter le faible contraste des éléments biologiques et ainsi extraire des informations. Ainsi on utilisera des techniques de coloration ou de marquage d'éléments spécifiques avec notamment l'utilisation de la fluorescence (Figure 2.11a) que nous décrirons en détail dans le chapitre 2.2. Des techniques sans marquage présentant des évolutions à partir du classique microscope en champ clair (Figure 2.11b) sont également disponibles en modifiant l'éclairage pour le champ sombre ou l'illumination oblique ou encore en introduisant des éléments optiques supplémentaires pour faire ressortir des éléments spécifiques dans le cas de la microscopie de phase. Ces techniques seront détaillées dans le chapitre 2.3.

La principale limitation de ces techniques est due à la limite de diffraction (ABBE, 1874) qui fixe la résolution maximale à $200nm$. Ces limitations nous permettent cependant de pouvoir atteindre nos objectifs d'étude, à savoir l'imagerie d'éléments intra-cellulaires vivants avec une faible toxicité.

FIGURE 2.11



(a) Image de fluorescence de cellules endothéliales (noyaux colorés en bleu, microtubules marqués en vert et filaments d'actine marqués en rouge). (b) Image en champ clair d'une cellule fibroblaste.

Conclusion

Avec pour objectif l'imagerie d'éléments intra-cellulaires et l'étude de leur comportement, le meilleur compromis entre résolution et observation d'échantillons vivants (voire *in vivo*) est clairement l'imagerie optique visible et dans le proche infra-rouge. En effet les techniques d'imagerie médicale conventionnelles sont lourdes en équipement et ne descendent pas suffisamment bas en résolution spatiale, de même que l'imagerie photoacoustique. La microscopie électronique ne fonctionne que sur échantillons fixés donc statiques, ce qui l'exclut directement de notre étude. Nous allons donc rentrer en détail dans les différents types d'imagerie optique disponibles afin de pouvoir trouver la meilleure combinaison à utiliser pour avoir des modalités d'imagerie des organites et des capacités de prédiction par apprentissage profond optimales sur échantillons vivants dans le temps et l'espace.

2.2 Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est un outil essentiel pour la recherche biologique et médicale. En effet elle a rendu possible l'identification de cellules et d'éléments sub-cellulaires ainsi que le suivi de protéines avec un grand niveau de spécificité au sein d'éléments non fluorescents.

Le phénomène de fluorescence décrit l'action par un atome, une molécule ou une nanostructure de relaxation dans un état d'énergie bas suite à une excitation *via* l'émission d'un photon. De l'énergie étant absorbée, la longueur d'onde du photon émis est plus grande que la longueur d'onde d'excitation (Figure 2.12). Ainsi, en illuminant les échantillons à étudier avec des faisceaux à haute intensité dans la zone d'absorption de certains éléments, on peut collecter des photons émis en réponse par ces éléments.

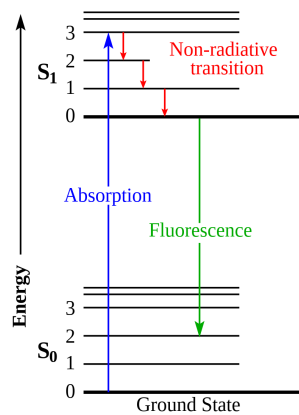


FIGURE 2.12 – Diagramme de Jablonski incluant les niveaux de vibration pour l'absorbance, les transitions non radiatives et la fluorescence.

Très peu d'éléments biologiques sont naturellement fluorescents, en particulier dans les cellules animales. Il est donc nécessaire d'introduire des fluorophores dans les échantillons biologiques à analyser. Ce processus, appelé marquage sera décrit en détail dans la partie 2.2.1. Le développement de la microscopie de fluorescence est directement lié au développement de nouveaux fluorophores naturels ou synthétiques possédant des profils d'excitation et d'émission connus adaptés aux cibles biologiques à marquer. Un des fluorophores les plus utilisés est la protéine de fluorescence verte (GFP) dont les spectres sont bien connus (Figure 2.13) et qui a comme avantages d'être petite, inerte et de diffuser rapidement à travers les cellules (CHALFIE, 2009). Nous explorerons dans la partie 2.2.2 les différents types de microscopes de fluorescence disponibles ainsi que leurs spécificités et leurs limites.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons cherché des solutions pour obtenir *in silico* le même type d'images que celles fournies par la microscopie de fluorescence afin de pouvoir s'en passer dans des études de longue durée ou du screening pour lesquels l'imagerie de fluorescence est à la peine.

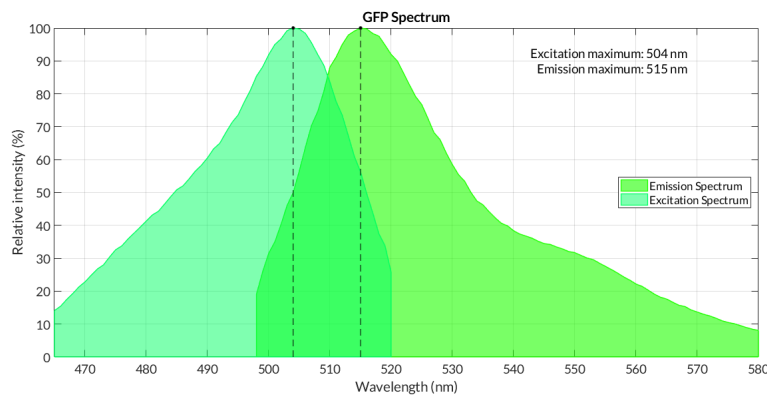


FIGURE 2.13 – Spectres d’excitation et d’émission de la *green fluorescent protein* (GFP).

2.2.1 Marquage de fluorescence

Afin d’obtenir de la spécificité dans les images de microscopie de fluorescence, on utilise des sondes fluorescentes. Ces sondes sont des fluorophores (de petites molécules, des protéines ou des boîtes quantiques) qui vont s’accrocher à des régions ou des groupes fonctionnels spécifiques au sein de la biomolécule cible. Le marquage fluorescent a pour avantages sa grande sensibilité et son caractère non-destructif.

En fonction de la nature de la cible, il existe différentes techniques de marquage :

- Les colorations chimiques réalisent un attachement des fluorophores aux molécules cibles. Ces méthodes sont robustes, facile à réaliser et très efficaces sur un grand panel de fluorophores (WOMBACHER, 2011). Elles sont cependant peu adaptées au marquage d’échantillons vivants.
- Des techniques de coloration enzymatiques peuvent être utilisées pour une coloration rapide et très efficace de protéines ou de cellules entières, y compris sur des échantillons vivants. Cependant, la grande taille des sondes peut interférer avec la fonction biologique des cibles.
- L’utilisation de peptide ou de protéine comme sonde permet la coloration spécifique et selective de protéines cibles. La nature très petite des sondes permet de ne pas perturber la fonctionnalité des molécules cibles (Y. WANG, 2008).
- L’immunofluorescence utilise la liaison entre anticorps et antigènes afin de cibler des cibles spécifiques (KAWAMURA, 1983).

Il est également possible de modifier génétiquement des lignées cellulaires afin qu’elles produisent des protéines fluorescentes liées à des sites chimiques spécifiques permettant de mettre en lumière des éléments intra-cellulaires particuliers. L’utilisation conjointe de marqueurs ayant des spectres d’émissions séparés attachés à des éléments cellulaires spécifiques permet la détection simultanée de différentes protéines (Figure 2.11a).

2.2.2 Principaux systèmes

Le principe de base de la microscopie de fluorescence consiste à illuminer un l'échantillon avec une source à haute intensité afin de déclencher l'émission de photons de plus faible intensité qu'il faut ensuite collecter. Nous détaillerons ici différentes techniques de microscopie de fluorescence, depuis la basique épifluorescence jusqu'à des systèmes plus complexes permettant de dépasser la limite de diffraction et d'atteindre de la super-résolution.

Epifluorescence

La majorité des microscopes de fluorescence utilisés suivent un schéma d'épifluorescence. En effet, la technique basique de microscopie de fluorescence est suffisante dans de nombreux cas de figure. Il s'agit d'illuminer l'échantillon en faisant passer la lumière d'éclairage à travers un objectif. On image ensuite la lumière émise par la fluorescence de l'échantillon à travers le même objectif. Comme la majorité de la lumière d'excitation est transmise à travers l'échantillon, seule la lumière d'éclairage réfléchie repasse par l'objectif en même temps que la lumière émise. On passe ensuite par un cube dichroïque séparateur afin de filtrer le résidu d'excitation. On collecte ensuite le signal sur un détecteur via un oculaire (Figure 2.14).

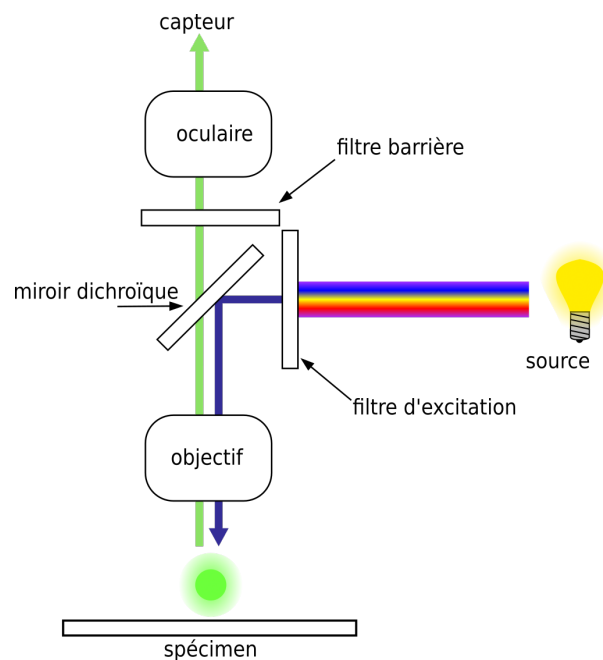


FIGURE 2.14 – Schéma de principe d'un microscope d'epifluorescence. On notera l'utilisation de miroir dichroïque et de filtre pour séparer les faisceaux.

La principale limitation de cette technique réside dans la nécessité pour l'objet à imager d'être contenu dans le plan focal du système pour éviter l'apparition de fond lumineux. On a donc une limitation due à la profondeur de champ qui devient problématique dans le cas d'échantillons épais.

Microscope confocal

Afin de résoudre les problèmes de signal parasite provenant de plans hors de la profondeur de champ, on place un trou de très faible diamètre appelé *pinhole* dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif et de la source (plans confocaux) (MINSKY, 1967) (DAVIDOVITS, 1969). Ainsi, seuls les photons provenant du plan focal passent le *pinhole* et participent à la formation de l'image (Figure 2.15).

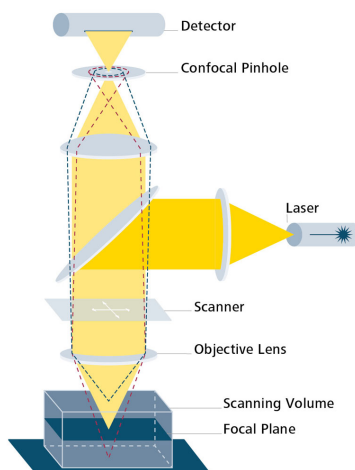


FIGURE 2.15 – Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope confocal. Image tirée de Zeiss.

L'utilisation d'une source d'illumination laser et d'un pinhole implique également la nécessité de scanner le plan d'imagerie latéralement pour venir illuminer l'ensemble du champ voulu. On peut pour cela utiliser des miroirs rotatifs finement contrôlés (PADDOCK, 2000), on parle dans ce cas de microscope confocal à balayage laser (Figure 2.16). Cette technique n'est pas très rapide, *a fortiori* en trois dimensions et est plus adaptée à l'imagerie d'échantillons fixés que d'échantillons vivants, mais offre une très bonne spécificité.

Une manière d'accélérer l'acquisition confocale est d'utiliser un microscope *spinning disk* qui utilise un groupe de pinholes mouvant sur un disque permettant d'acquérir de multiples zones simultanément et ainsi d'accélérer grandement l'acquisition de l'image complète. On augmente également le temps d'illumination de chaque zone, ce qui réduit le besoin en intensité d'excitation et donc la phototoxicité. On préférera donc cette méthode pour l'étude confocale d'éléments vivants (TANAAMI, 2002).

Microscopie multi-photons

La microscopie à deux photons consiste à stimuler le fluorophore par l'absorption simultanée de deux photons d'excitation (DENK, 1990) (Figure 2.17). Cette technique présente plusieurs intérêts majeurs, à savoir la possibilité d'utiliser

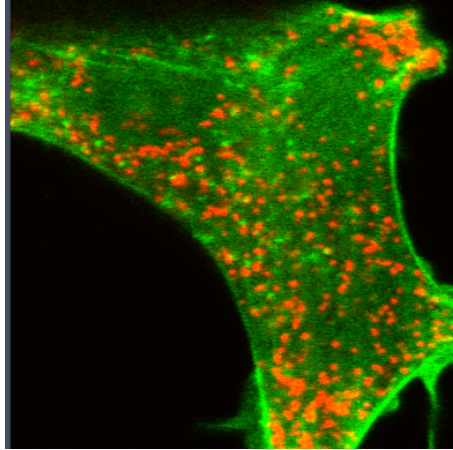


FIGURE 2.16 – Image de fluorescence par microscopie confocale à balayage d’une cellule chromaffine avec marquage des vésicules (rouge) et actin (vert). Image réalisée à l’Université du Queensland.

une longueur d’onde plus grande pour l’excitation que pour l’émission, la restriction de l’excitation à un faible volume focal due à la probabilité d’excitation directement liée à la quantité de photons dans un espace donné mais aussi la réduction du bruit de fond grâce à l’absorption de deux photons pour l’excitation. L’utilisation de longueur d’onde d’excitation importante ouvre la voie à l’utilisation d’excitation dans l’infrarouge, offrant une plus grande capacité de pénétration dans les tissus. En revanche, cette technique nécessite l’utilisation de lasers pulsés afin de concentrer suffisamment de photons au même endroit pour pouvoir induire le phénomène d’excitation, ce qui peut être source de dégâts rapides et du photoblanchiment.

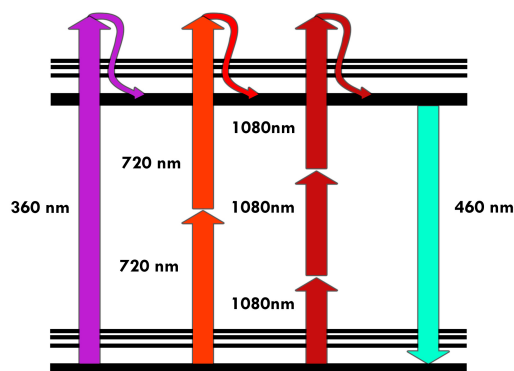


FIGURE 2.17 – Diagramme de Jablonski simplifié pour l’excitation 1, 2 ou trois photons d’un fluorophore émettant à 460 nm. Une fois l’état excité atteint, l’émission de fluorescence est identique pour les trois modalités d’excitation. Image réalisée par Alberto Diaspro.

De manière équivalente, la microscopie à trois photons nécessite l’absorption simultanée de trois photons par le fluorophore pour passer dans un état excité (Figure 2.17). La pénétration dans les tissus diffusants est alors encore meilleure grâce à une longueur d’onde d’excitation dans l’infrarouge (HORTON, 2013). La réduction de la fluorescence générée en dehors du plan est plus rapide que pour

son équivalent à deux photons ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution axiale. Ses limitations sont les mêmes que pour la microscopie deux photons dans des proportions supérieures dues au besoin d'absorption de trois photons en simultané. Ses principales applications portent sur l'accès en profondeur de tissus diffusants tels que le cerveau (KERR, 2008).

La microscopie par génération de second harmonique (SHG) ou génération de troisième harmonique (THG) utilise les propriétés non-linéaires de certains milieux ou éléments et consiste en un doublement (CAMPAGNOLA, 2001) (respectivement triplement (SCHRADER, 1997)) exact de la fréquence de la lumière traversant ces milieux (Figure 2.18). Les principaux avantages de ces techniques sont l'absence de nécessité de marquage des échantillons et la non absorption de la lumière. En revanche, les éléments ne présentant pas les propriétés non-linéaires nécessaires à la génération d'harmoniques ne peuvent être imagés.

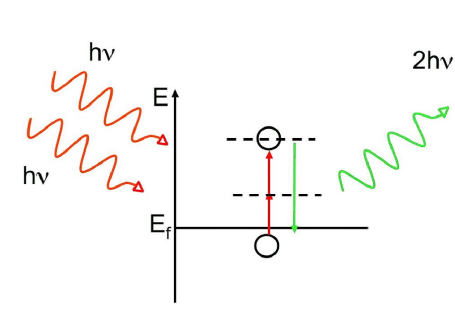


FIGURE 2.18 – Diagramme de Jablonski simplifié du phénomène de génération de second harmonique.

Ses principales applications tirent profit de la capacité du collagène à générer du signal de second harmonique permettant par exemple d'identifier des cancers du sein (ALOWAMI, 2003). Cette technique est souvent utilisée en complément d'autres techniques non-linéaires.

Super-résolution

La principale limitation dans la résolution obtenue par la microscopie optique est liée à la limite de diffraction. De nombreuses techniques ont ainsi été développées au cours des dernières années afin de dépasser cette limite et atteindre une imagerie dite de super-résolution. On peut distinguer trois grandes techniques dont sont dérivées un ensemble de méthodes spécifiques : la microscopie à illumination structurée, la déplétion par émission stimulée (*stimulated-emission depletion* ou STED) et la microscopie de localisation.

La limite de résolution est due à l'ouverture numérique finie qui agit comme un filtre passe-bas sur les angles collectés. Il coupe les hautes-fréquences issues de l'objet, qui contiennent les détails et contribuent à une meilleure résolution. En illuminant l'échantillon avec une illumination spécifique, on peut combiner une partie des hautes fréquences avec les fréquences plus basses de l'illumination via un phénomène de Moiré. C'est le principe de la microscopie à illumination

structurée (SIM). Une partie des fréquences auparavant coupées est alors remplacée à l'intérieur du plan focal arrière, et deviennent détectables. En pratique la SIM est réalisé sous différentes illuminations, notamment des translations et des rotations : généralement 9 images sont nécessaires pour reconstruire une image 2D et 15 pour une image 3D. Les premiers usages de cette technologie ont permis d'atteindre des résolutions de 50nm (GUERRA, 1995) (Figure 2.19).

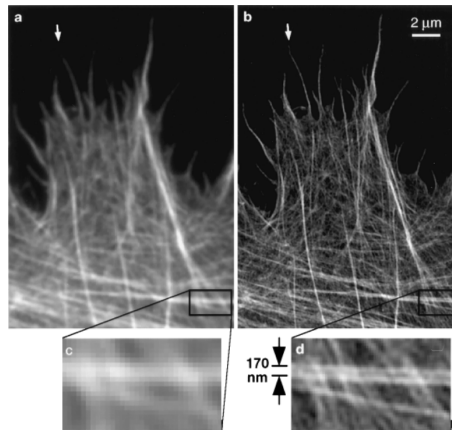
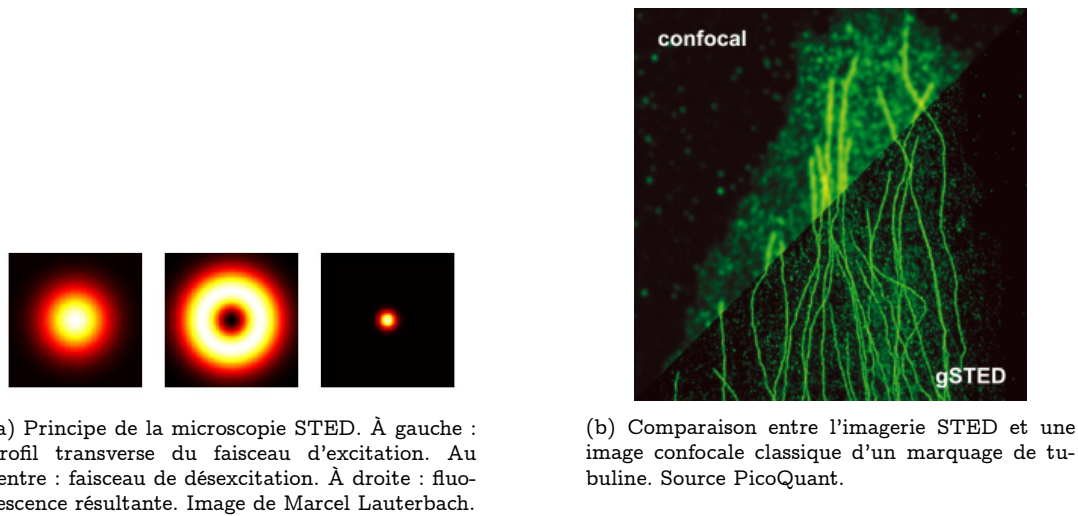


FIGURE 2.19 – Le cytosquelette d'actin aux bords d'une cellule HeLa, imagé par microscopie de fluorescence conventionnelle (a, c) et microscopie à illumination structurée (b, d). Les épaisseurs apparentes des fibres les plus fines (flèches) sont réduites à $110\text{--}120\text{ nm}$ en (b), comparées à $280\text{--}300\text{ nm}$ pour (a). Figure tirée de (GUSTAFSSON, 2000).

La microscopie STED est une dérivation de la microscopie de fluorescence à balayage dont l'illumination est mise en forme pour dépasser la limite de diffraction (HELL, 1994). Cette limite est dépassée en désactivant sélectivement les fluorophores en dehors de la réponse impulsionnelle optique d'excitation à l'aide d'un faisceau de désactivation. On ajuste ainsi la largeur de la zone centrale pouvant émettre de la fluorescence (Figure 2.20a). Cette technique a permis d'atteindre des résolutions latérales de quelques dizaines de nanomètres et a permis de se rapprocher des études à l'échelle sub-organelle (SINGH, 2012) autrement réalisables uniquement grâce à la microscopie électronique. Des utilisations sur échantillons vivants peuvent permettre d'étudier les dynamiques fines comme les mouvements des vésicules synaptiques (WESTPHAL, 2008).

La microscopie de localisation consiste à isoler des émetteurs de fluorescence uniques et à les comparer avec la fonction d'étalement du point pour obtenir une localisation très fine du centre d'émission. Afin d'isoler les fluorophores, on utilise l'activation séquentielle et la localisation résolue dans le temps de fluorophores photo-activables. On notera parmi les méthodes les plus utilisées la microscopie par reconstruction optique stochastique (STORM) (RUST, 2006), la microscopie par localisation photo activée (PALM) (BETZIG, 2006) et la microscopie par localisation de fluorescence photo-activée (FPALM) (HESS, 2006). La séparation des fluorophores et la réduction de la taille des taches de fluorescence permettent l'obtention d'images mieux résolues (Figure 2.21). La capacité à obtenir des informations d'émetteurs uniques limite néanmoins

FIGURE 2.20



la capacité à réaliser des études sur des échantillons vivants. En effet, pouvoir collecter suffisamment de photons provenant un émetteur unique dans un court laps de temps est très compliqué.

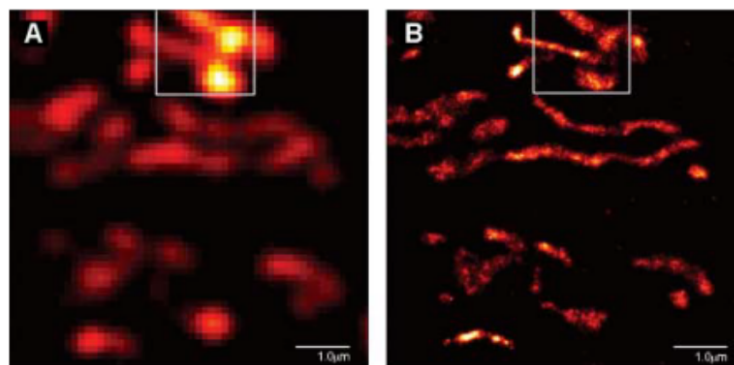


FIGURE 2.21 – Images comparatives de mitochondries dans une fine section figée dans le froid de cellule *cos-7* imagées par TIRF (A) et PALM (B). Figure tirée de (BETZIG, 2006).

Il pourrait être intéressant, à terme de tester l'approche développée durant ma thèse sur des apprentissages en super-résolution pour les cas où l'approche vivante n'est pas recherchée. Ces évolutions et tests sont cependant des projets à long terme et sortent du cadre de mes trois années de thèse.

2.2.3 Synthèse critique

De nombreuses techniques utilisant la fluorescence ont été développées afin d'imager des éléments biologiques à diverses échelles allant du tissu (quelques centimètres) aux protéines (quelques dizaines de nanomètres). Le point commun de ces techniques est le besoin d'utiliser des fluorophores attachés aux éléments d'intérêt qui vont être activés grâce à une source lumineuse à haute intensité. Les différences entre ces technologies résident dans les compromis

réalisés entre capacité de résolution, photo-toxicité, temps d'acquisition et complexité des systèmes.

Notre objectif est l'étude des éléments sub-cellulaires, en particulier les mitochondries et le réticulum endoplasmique, ainsi leur comportement. Nous avons donc besoin de la spécificité apportée par l'utilisation de la fluorescence. Comme nous nous situons au niveau d'éléments ayant des diamètres de l'ordre du micron (entre 0.7 et 3 μm pour les mitochondries), il n'est pas particulièrement nécessaire d'utiliser des techniques de super-résolution. Ainsi avec l'utilisation de fluorophores particuliers liés aux mitochondries ou au réticulum endoplasmique, nous pouvons utiliser de l'épifluorescence ou de la microscopie confocale pour obtenir une segmentation correcte sans être trop invasifs au niveau de l'éclairage. L'utilisation d'une source de forte fluence pour générer le signal de fluorescence induit cependant de la toxicité et limite donc la durée d'exposition possible avant d'infliger des dégâts à la cellule et donc le nombre d'images pouvant être acquises dans le temps. Un arbitrage est donc nécessaire entre durée et fréquence d'acquisition.

Le travail de recherche que j'ai mené s'inscrit dans une idée de contournement de l'utilisation de l'imagerie de fluorescence. L'objectif est de déterminer la possibilité d'obtenir un signal robuste et fiable sans avoir recours à la fluorescence.

Concrètement, nous allons utiliser l'imagerie de fluorescence dans la phase d'apprentissage de nos algorithmes afin de constituer les signaux cibles. Parmi toutes ces approches, nous avons décidé d'utiliser de la fluorescence en champ large pour sa simplicité et sa rapidité d'imagerie, les échantillons considérés (cellules adhérentes) ne faisant que quelques micromètres d'épaisseur. Une application de notre approche à des échantillons plus épais nécessitera peut-être le recours à de l'imagerie de fluorescence confocale.

2.3 Microscopie sans marquage

2.3.1 Principaux concepts

La microscopie optique en champ clair est la technique de microscopie optique originelle. L'illumination est réalisée par transmission de lumière blanche. Elle a pour atouts d'être très simple dans sa mise en place et son utilisation et ne requiert qu'une préparation minimale de l'échantillon. En revanche, elle souffre d'un gros manque de contraste sur les objets biologiques. En particulier, les cellules animales sont quasiment transparentes aux longueurs d'onde visibles (Figure 2.22).

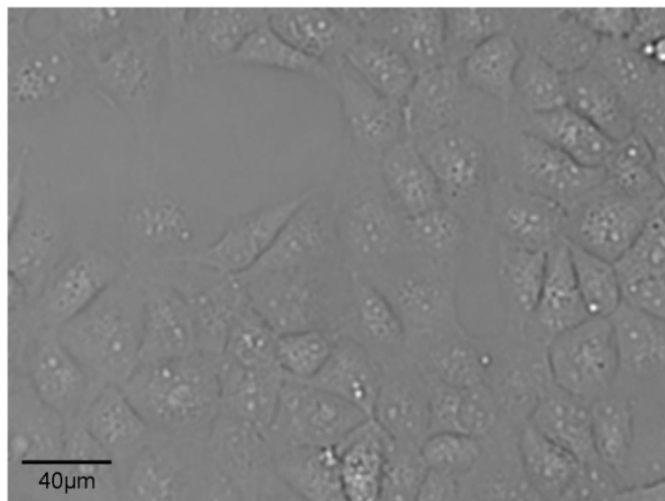


FIGURE 2.22 – Exemple de cellules animales COS7 cultivées *in vitro* observées au microscope en imagerie d'intensité.

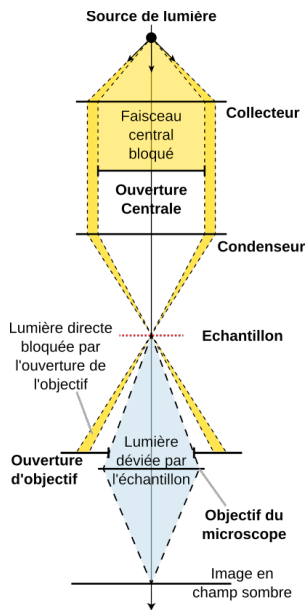
La microscopie optique sans marquage regroupe un ensemble de techniques visant à compenser les limitations de contraste intrinsèques aux échantillons observés à l'aide de variations sur l'éclairage ou grâce à l'ajout d'éléments optiques dans le montage. Nous allons ici décrire les plus importantes d'entre elles, leurs applications ainsi que leurs avantages et inconvénients.

2.3.2 Microscopie en champ sombre

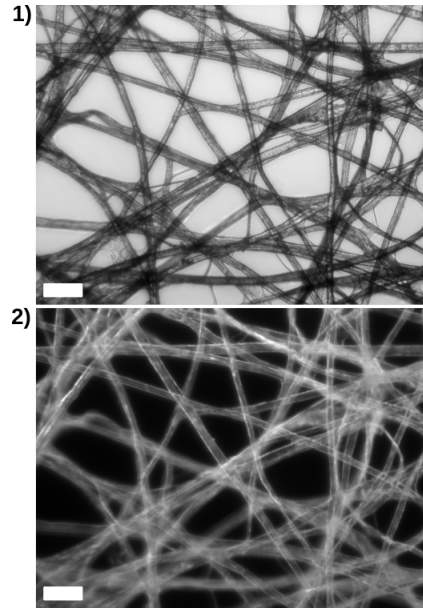
La première adaptation que je mentionnerai ayant vu de nombreuses applications est la microscopie en champ sombre (HORIO, 1986). Le concept de cette microscopie est d'utiliser la déviation des rayons lumineux par l'échantillon traversé. On fait en sorte qu'aucune lumière directe ne soit collectée par l'objectif à l'aide d'une illumination avec des angles supérieurs aux angles de collection du microscope. Ainsi, la lumière non déviée passe complètement à côté de l'ouverture de l'objectif, et seule la lumière déviée par le passage dans l'échantillon est collectée (Figure 2.23a).

Les principaux avantages amenés par ce type d'éclairage résident dans un fort

FIGURE 2.23



(a) Diagramme illustrant le chemin optique d'un microscope en champ sombre. Image adaptée de ROoland.



(b) Image de papier absorbant avec un microscope à illumination à champ clair (1) et à champ sombre (2). Echelle : $200\mu m$. Figure adaptée de Richard Wheeler.

contraste pour des petits éléments au sein d'échantillons minces et la possibilité de détecter des objets en dessous de la limite de résolution avec un éclairage suffisamment fort. Les images à fond sombre sont également moins fatigantes à regarder à l'oeil (Figure 2.23b). En revanche, ce sont les changements d'indices de réfractifs qui génèrent les rayons qui vont être collectés, les milieux homogènes ne sont pas visibles et on ne distingue souvent que des contours. De plus comme l'ouverture de l'objectif doit être réduite, on perd en résolution. Cette technique d'illumination est souvent utilisée en même temps que d'autres techniques d'augmentation du contraste.

2.3.3 Microscopie en lumière polarisée

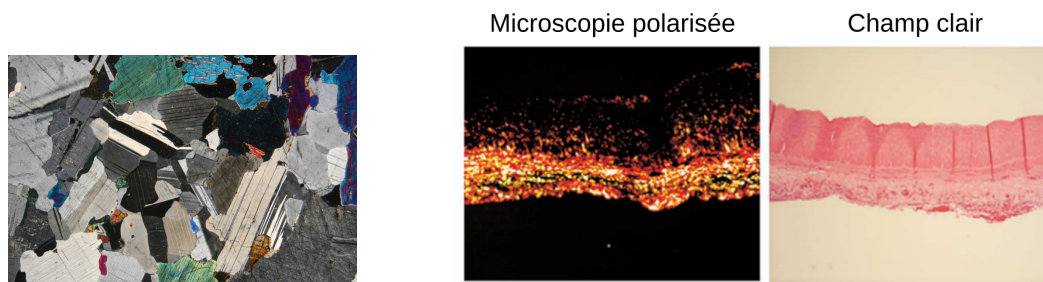
Les matériaux isotropes, comme les gaz, les liquides, ou des cristaux sous forme cubique ont des propriétés optiques identiques quelle que soit la direction initiale d'illumination de ces matériaux. Ils ont donc un indice optique unique. Au contraire, les matériaux anisotropes ont des propriétés optiques différentes selon l'orientation de l'illumination : différents indices en fonction des axes cristallins par exemple. La microscopie en lumière polarisée est un microscope en champ clair modifié afin d'utiliser ces propriétés optiques.

On place un polariseur au niveau du condenseur pour illuminer le spécimen avec une lumière polarisée linéairement. Ce polariseur est souvent rotatif pour pouvoir changer l'angle de polarisation de la lumière incidente par rapport au spécimen. Au niveau de l'objectif, on place un deuxième filtre polarisant, l'analyseur. Le polariseur et l'analyseur sont positionnés avec des axes optiques

orthogonaux (CARLTON, 2011). Dans cette configuration de polariseurs croisés, la lumière ne peut pas passer dans le microscope, on observe donc un champ sombre en l'absence de spécimen. La lumière passant à travers l'échantillon se découpe en deux rayons de polarisation différentes qui se propagent avec une vitesse différente via le phénomène de biréfringence. Ce phénomène est équivalent à une rotation de polarisation. Le passage par l'analyseur ne va ainsi garder que les rayons ayant tourné en polarisation et fournir une luminosité directement liée à cette rotation.

Ce type de microscopie est très utile pour l'étude de milieux biréfringents et est particulièrement utilisé pour la géologie et cristallographie (Figure 2.24a). On notera également des applications pour l'étude de certains éléments biologiques particuliers tels que le collagène (WOLMAN, 1986) qui présente des propriétés optiques adaptées à ce type d'observation (Figure 2.24b). Cependant, peu d'échantillons biologiques satisfont les pré-requis de la microscopie en lumière polarisée, et les éléments que nous désirons observer à l'intérieur des cellules n'en font pas partie, ce qui disqualifie cette technique pour notre étude.

FIGURE 2.24



(a) Image d'une fine section de gabbro en lumière polarisée. Image réalisée par Siim Sepp.

(b) Imagerie d'une artère par une modalité de microscopie à lumière polarisée mettant en lumière le collagène et en champ clair. Figure adaptée de (GHOSH, 2006).

2.3.4 Microscopie de phase

Même si les échantillons biologiques animaux n'absorbent que très peu la lumière, les rayons lumineux vont être modifiés par le passage dans l'échantillon, avec notamment un décalage temporel dépendant de l'indice optique des milieux traversés. Les techniques de microscopie de contraste de phase viennent générer du contraste d'intensité lumineuse lorsque l'indice de réfraction est inhomogène.

Microscopie à contraste de phase de Zernike

Dans les années 30, Frits Zernike a introduit le microscope à contraste de phase pour résoudre ce problème. La compréhension du microscope à contraste de phase fait appel à une interprétation du mécanisme de formation des images (ZERNIKE, 1942). Un spécimen de phase altère le faisceau d'illumination en le

diffraction. La microscopie à contraste de phase s'inspire du mécanisme qui crée les couleurs en microscopie polarisée, les interférences, afin de transformer les variations de phases en variation d'intensité. L'ordre de diffraction zéro est la partie du faisceau d'illumination qui traverse le spécimen tout en étant inaltérée par celui-ci.

On insère une lame de phase et d'amplitude permettant de déphaser et d'atténuer le faisceau incident par rapport au faisceau diffracté dans le plan focal arrière de l'objectif afin d'améliorer le phénomène d'interférence entre les rayons diffractés et les rayons non-diffractés (on parle d'interféromètre balancé) et de révéler ainsi l'échantillon. L'ensemble des rayons diffractés traverse aussi ce plan. Pour affecter sélectivement les rayons de l'ordre zéro, on utilise un diaphragme annulaire pour la source, placé au niveau de l'ouverture du condenseur, qui est le plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif. Il suffit alors de placer la lame de phase et d'amplitude dans ce plan pour qu'elle soit automatiquement superposée à l'image du diaphragme du condenseur et ainsi affecter les rayons non diffractés sans déphaser les rayons diffractés (Figure 2.25).

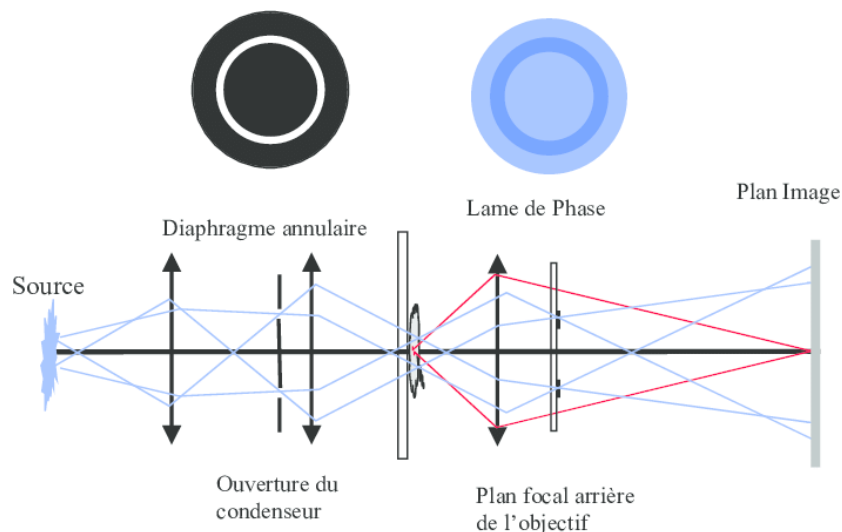


FIGURE 2.25 – Schéma de principe du microscope à contraste de phase. Les rayons diffractés sont en rouge. Image réalisée par Oliver Haberlé.

La microscopie à contraste de phase qui permet de transformer un objet de phase en un objet d'amplitude visible en intensité est très intéressante en biologie car elle permet d'étudier des spécimens sans avoir à les colorer, comme en microscopie en transmission, où à les marquer par des fluorophores spécifiques (Figure 2.26). Elle est cependant limitée en terme de résolution des détails et la présence d'un halo rend compliquée l'interprétation des images lorsque l'échantillon est dense.

Microscopie à contraste interférentiel

Le contraste interférentiel différentiel (DIC) est une technique de décalage interférométrique à deux ondes. Son principe repose sur la division d'un rayon

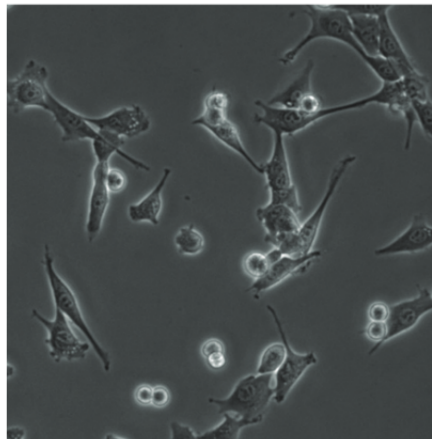


FIGURE 2.26 – Image de deux douzaines de cellules par microscopie de phase de Zernike. Image tirée de (INGLIS, 2010).

lumineux polarisé en deux rayons de même longueur d'onde, mais polarisés orthogonalement et séparés spatialement d'une distance très courte (une fraction de la longueur d'onde) (NOMARSKI, G., 1955). La séparation en deux rayons est réalisée par un prisme de Wollaston (assemblage de cristaux biréfringents). Ces rayons traversent l'échantillon en deux points différents mais très proches. Suivant les milieux traversés par chacun, ceux-ci peuvent subir un déphasage différent. Après collection par l'objectif, les rayons sont recombinés par un second Wollaston et viennent interférer sur un filtre polariseur. Suivant la différence de phase entre les rayons, un contraste positif ou négatif sera créé révélant ainsi les structures cellulaires (Figure 2.27).

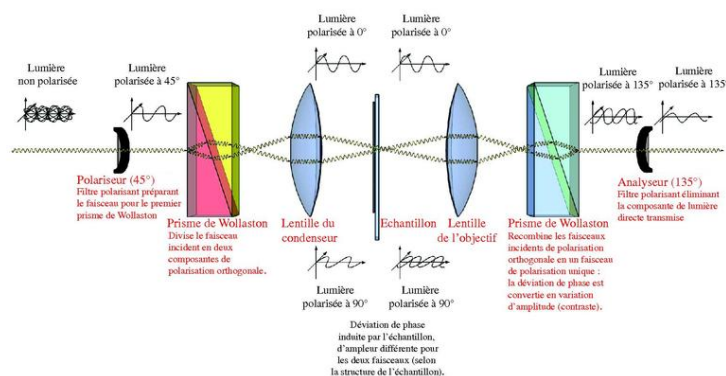


FIGURE 2.27 – Schéma de principe du fonctionnement du contraste interférentiel différentiel. Image réalisée par Richard Wheeler.

Les images obtenues à l'aide de cette technique mettent en valeur les changements d'épaisseur optique. On ne détecte cependant que des variations suivant

l'axe de décalage du montage. Pour remédier à cet inconvénient, on effectue plusieurs mesures avec des axes complémentaires. Elle sera donc très utile pour détecter des petits changements d'indices et pour imager les éléments ayant un indice de réfraction très proche de celui du milieu environnant.

Les principales limitations de cette technique sont sa forte dépendance aux changements d'indices pour fonctionner, menant à un faible contraste sur des intérieurs cellulaires et limiter la vision d'éléments fins pour lesquels on préférera la microscopie de phase (Figure 2.28).

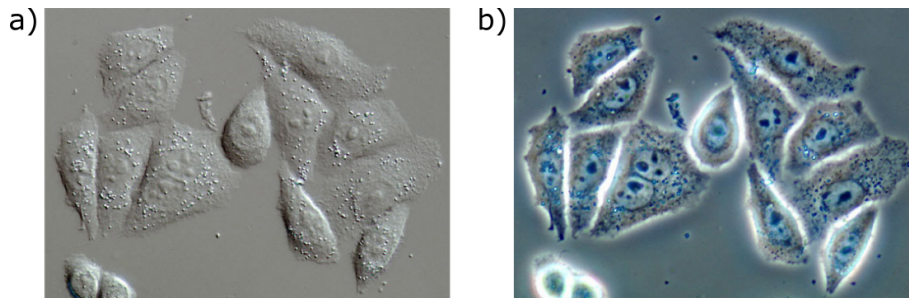


FIGURE 2.28 – Imagerie de cellules HeLa avec une modalité de contraste interférentiel différentiel (a) et une modalité de phase (b). Image adaptée de Nikon microscopy.

2.3.5 Microscopie de phase quantitative

Nous allons maintenant décrire les techniques de microscopie proposant de mesurer quantitativement la différence de chemin optique (appelée phase par abus de langage) introduite par le passage de la lumière dans un échantillon. L'aspect quantitatif des mesures réalisées à l'aide de ces méthodes, tout particulièrement la dernière que nous avons exploitée au cours de cette thèse, permet l'accès à des informations sur les échantillons biologiques observés allant plus loin que la simple segmentation.

Holographie numérique

La microscopie holographique consiste en la reconstruction holographique d'images de phase et d'intensité provenant d'un objet (GABOR, 1948). Ce microscope est basé sur un montage de type Mach-Zender (Figure 2.29 gauche). On sépare un faisceau incident cohérent spatialement en deux faisceaux identiques. L'un va se propager dans le bras de mesure où se trouve l'échantillon, y accumuler une différence de chemin optique, puis dans un objectif d'imagerie. L'autre, qui va servir de référence, va se propager à travers un objectif de compensation identique à celui d'imagerie. Les deux faisceaux sont ensuite recombinaés et vont interférer sur un détecteur.

Les images obtenues sur le détecteur vont former un réseau de franges d'interférences, homogène en l'absence d'objet, et déformé localement par les différences de chemin optique introduites par l'échantillon. Cette déformation des franges

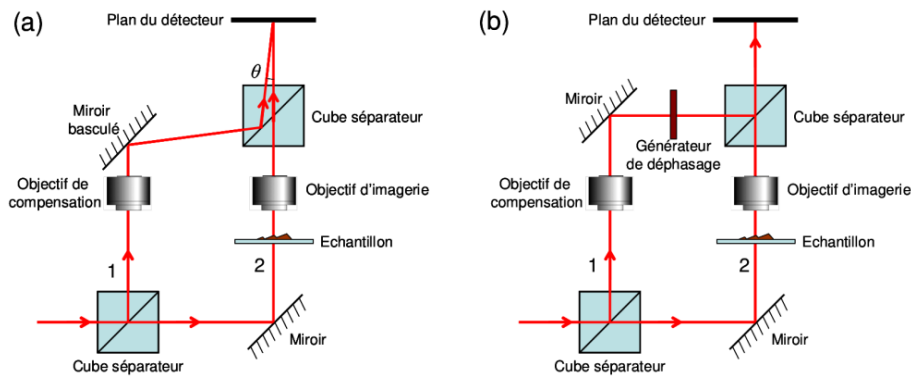


FIGURE 2.29 – Microscope holographique de type hors-axe. Le faisceau issu du bras de référence forme un angle θ par rapport à celui venant du bras de mesure (a). Microscope holographique par modulation de phase. Un générateur de déphasage variable est présent dans le bras de référence (b).

périodiques peut être vue comme une modulation fréquentielle de l'interférogramme autour de la fréquence des franges, par la différence de chemin optique introduite par l'échantillon. Cette technique présente des similarités avec celle que nous utiliserons pour mesurer des gradients de différence de chemin optique et que nous détaillerons au chapitre 3.1.2.

Les progrès et le développement des outils de calcul numérique ont permis, à l'aide de caméras numériques, d'extraire les différences de chemin optique par traitement numérique de l'interférogramme dans l'espace de Fourier. Ainsi, la principale limitation de cette technologie qui résidait dans la complexité des calculs a été levée et des mesures de différences de chemin optique sur l'ensemble du champ à une vitesse limitée uniquement par l'acquisition de la caméra ont été rendues possibles.

Un des avantages de cette approche d'holographie numérique est la possibilité de reconstruire l'image dans n'importe quel plan de mise au point (CUCHE, 1999). L'acquisition de l'amplitude et de la phase du champ électromagnétique dans un plan permet théoriquement, via l'utilisation du propagateur de Fresnel (Chapitre 4.4), de reconstruire le champ dans n'importe quel autre plan. Nous utiliserons en partie cette technique dans notre étude d'échantillons en 3D (Chapitre 4).

La figure 2.29(b) présente un montage proche de celui de la figure 2.29(a) à la différence qu'on a placé un générateur de déphasage dans le bras de référence et supprimé l'angle θ entre les deux bras (montage holographique sur l'axe). On utilise alors un algorithme d'interférométrie à décalage de phase (CREATH, 1988) sur une série d'acquisitions pour extraire la phase.

Ces techniques d'holographie numérique permettent une reconstruction précise de la phase. Le montage est relativement simple mais la cohérence de l'éclairage limite la résolution, rend difficile l'utilisation sur des échantillons épais et crée un phénomène de tavelure qui diminue le rapport signal sur bruit.

Imagerie multiplans en intensité

L'imagerie multiplans en intensité consiste à utiliser une série d'acquisitions de microscopie classique dans différents plans de mise au point afin de remonter à la phase de l'onde électromagnétique. Cette technique repose sur la notion de propagation des faisceaux lumineux. Si l'information est portée uniquement par la phase dans un plan donné, la diffraction dans l'espace libre va générer un transfert d'une partie de l'information vers l'intensité dans un autre plan et l'objet y apparaîtra flou avec du contraste sur l'intensité (Figure 2.30).

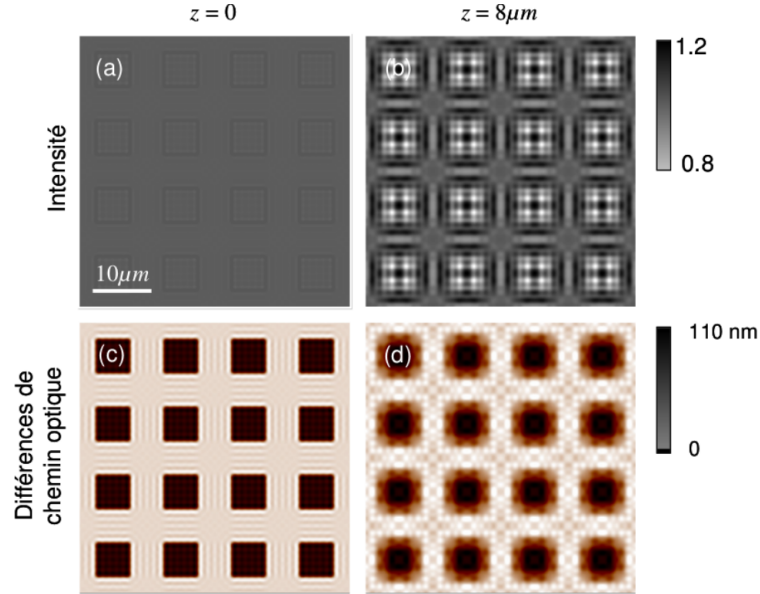


FIGURE 2.30 – Transfert d'information de la phase vers l'intensité lors de la propagation d'un champ électromagnétique. Intensité dans le plan $z = 0$ (a). Intensité dans le plan $z = 8\mu m$ (b). Différences de chemin optique dans le plan $z = 0$ (c). Différences de chemin optique dans le plan $z = 8\mu m$ (d). Images obtenues par simulation *via* produit de convolution sur un échantillon de silice gravée.

Il est possible de donner une relation non-linéaire (BARTY, 1998) entre la variation axiale de l'intensité et les variations latérales de la phase et de l'intensité, appelée équation de transport de l'intensité :

$$k_0 \frac{\delta I(x, y, z)}{\delta z} = -\Lambda[I(x, y, z) \cdot \Lambda \phi(x, y, z)]. \quad (2.1)$$

Avec :

- I : l'intensité du champ,
- ϕ : la phase du champ en radians,
- Λ : l'opérateur gradient.

Expérimentalement, à partir de mesures de l'intensité dans différents plans il est possible de remonter à la phase. La sensibilité de la mesure avec le nombre de

plans nécessaires et la distance séparant chaque plan, ainsi que la non-linéarité de l'équation à résoudre, rendent difficile l'implémentation de cette technique, quels que soient l'objectif et l'échantillon considérés.

Cette technique présente l'avantage d'être *a priori* utilisable sur n'importe quel microscope. Cependant, lorsque l'on souhaite une sensibilité importante, quel que soit le contenu fréquentiel des images, il est nécessaire d'acquérir un grand nombre d'images. Cette technique n'est donc pas adaptée à l'étude de phénomènes dynamiques et donc à l'étude du vivant.

Ce type de microscopie est très proche dans son concept de l'acquisition de phase utilisée pour la reconstitution d'images de fluorescence à partir d'images sans marquage (CHRISTIANSEN, 2018) dont nous souhaitons nous rapprocher dans cette thèse. La différence majeure se situe cependant dans l'utilisation d'une techniques de microscopie quantitative de phase (2.3.5) différente dans notre cas afin de réaliser l'étude sur des échantillons biologiques vivants.

Interférométrie à décalage

Le groupe de Pierre Bon, dans lequel j'ai effectué ma thèse, est spécialiste d'une variation de la microscopie de phase classique, à savoir la mesure de front d'onde par interférométrie à décalage quadrilatéral.

L'interférométrie à décalage latéral repose sur le phénomène d'interférences entre N (4 dans le cas du décalage quadrilatéral qui nous intéresse particulièrement) ondes cohérentes entre elles, légèrement décalées spatialement les unes par rapport aux autres. Les interférences présentent une figure d'intensité périodique et on observe une modulation locale de cette période lorsque localement la phase présente une variation spatiale (Figure 2.31).

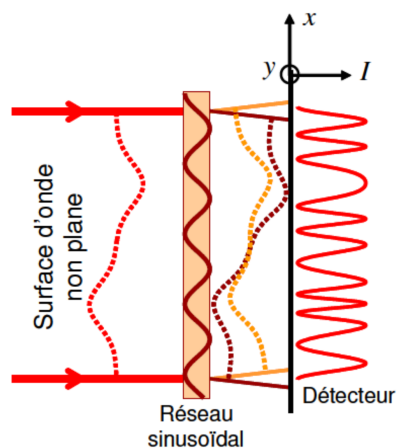


FIGURE 2.31 – Principe de l'interférométrie à décalage latéral. On voit la séparation en deux fronts d'onde identiques décalés et la création de l'interférogramme sur le capteur.

La base de cette technique avec un décalage sur une dimension permet de mesurer des gradients selon un axe bien défini de manière similaire à la microscopie

à contraste différentiel (Chapitre 2.3.4). Afin de passer en deux dimensions, nous utilisons de l'interférométrie à décalage quadrilatéral. Nous allons générer quatre fronts d'ondes décalés à l'aide d'un réseau en deux dimensions appelé masque de Hartmann. Lors de l'utilisation d'un tel réseau, de nombreux ordres vont être diffractés dans les deux directions et vont venir polluer la mesure. Il est donc nécessaire de supprimer les ordres parasites et de ne garder que quatre ondes (deux dans chaque direction) et c'est la raison de l'utilisation d'un masque de Hartmann modifié (PRIMOT, 2003).

Un premier moyen de sélectionner les ordres transmis est de jouer sur les paramètres de notre réseau. La modification du pas ne joue en aucun cas. Cependant, le fait d'introduire un rapport cyclique sur la transmittance, c'est-à-dire d'alterner des zones transmettant la lumière et d'autres la coupant, permet d'introduire une fonction porte qui, une fois passée dans l'espace de Fourier, va se traduire par une modulation par un sinus cardinal du signal obtenu. Cette modulation vient supprimer les ordres 3 et -3 en superposant un masque de phase au réseau de diffraction afin de déphaser de π deux cases adjacentes (Figure 2.32). On produit des interférences destructives sur les ordres pairs. Il ne reste donc que les ordres 1 et -1, ainsi que les 5 et -5 dont les intensités sont négligeables.

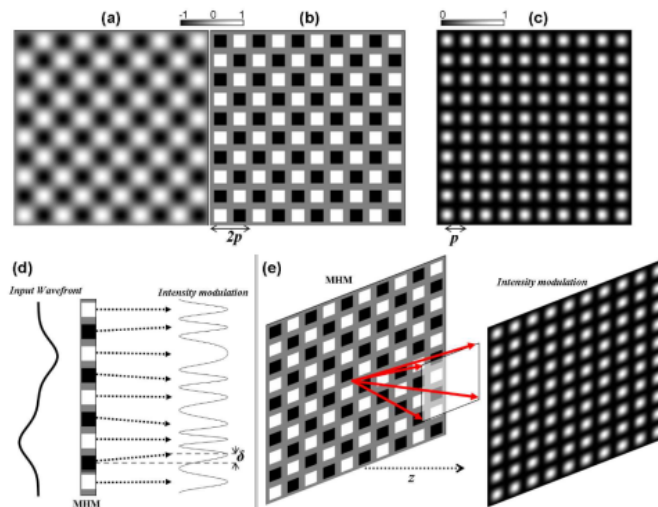


FIGURE 2.32 – (a) Transparence idéale pour un réseau de diffraction 2D à 4 ondes. (b) Transparence du masque de Hartmann modifié (MHM). (c) Transmission d'intensité de (a). (d) Interférogramme 1D formé par passage dans un MHM d'un front d'onde perturbé. (e) Formation d'interférogramme 2D pour une onde plane passant par un MHM, avec représentation des quatre ondes diffractées. Figure adaptée de (BON, MAUCORT, 2009).

Nous obtenons donc un interférogramme sur le détecteur dont nous pouvons mathématiquement extraire les composantes d'intensité et de phase. Nous décrirons plus en détail ce processus dans le chapitre 3.1.2.

Cette technique est particulièrement adaptée à l'étude cellulaire étant donné que le passage de la lumière à travers la cellule va être perturbé par les éléments rencontrés. Ces déformations sont dues à des modifications de l'épaisseur

optique, à savoir, en première approximation, le produit entre épaisseur réelle et indice de réfraction optique. Nous allons donc observer des changements de milieu traversé, et donc la géométrie des cellules ainsi que leurs composants (Figure 2.33).

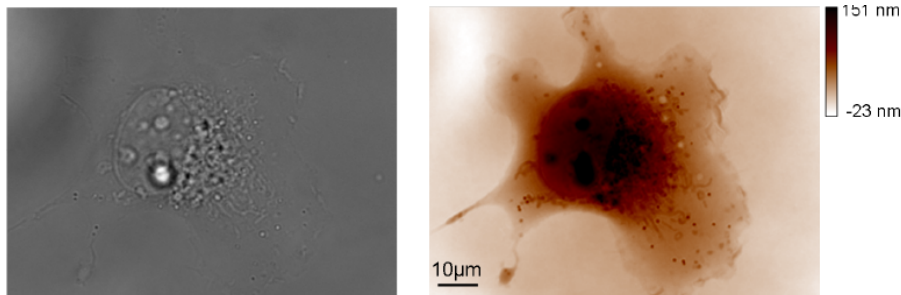


FIGURE 2.33 – Image d'intensité (a) et de phase (b) d'une cellule COS-7.

Seule l'inclusion du masque de Hartmann modifié sur le chemin optique est nécessaire à l'utilisation de cette technique, ce qui la rend peu complexe à mettre en oeuvre même sur des microscopes commerciaux. La principale limitation de cette technique, comme pour toutes les techniques de phase quantitative, réside dans le besoin d'observer des cellules relativement plates et étalées afin de pouvoir correctement interpréter les images.

Il est à noter qu'un accès à l'intensité lumineuse est possible (Figure 2.33 gauche) et sera très utile comme nous le verrons au chapitre 3.3.1.

2.3.6 Synthèse critique

La microscopie sans marquage a pour principal objectif de limiter l'invasivité sur l'échantillon observé. En effet, elle ne demande pas de préparation particulière ou de modification de l'échantillon biologique, et fonctionne avec des éclairages peu intenses en non focalisés qui n'ont qu'un impact très réduit sur les échantillons. Ce sont donc des techniques permettant d'utiliser une illumination continue furtive et ainsi de réaliser des acquisitions de longue durée à des fréquences uniquement limitées par les taux d'acquisition des caméras.

Ce type de microscopie possède cependant des limitations. En particulier le fait d'observer l'intégralité des éléments de l'échantillon, dans notre cas des cellules, implique un besoin d'échantillons fins pour permettre de différencier les informations collectées. Comme on collecte l'intégralité de l'information des différences de chemin optique, on est très peu spécifique. Les zones chargées en éléments biologiques proposent également un défi, au même titre que les échantillons trop épais.

Cependant, dans le cas de la microscopie de phase qui nous intéresse particulièrement, il est possible de détecter facilement certaines organelles et éléments particuliers de la cellule. De plus, nous collectons l'intégralité des sources de retard de chemin optique, que ce soit dans le plan d'imagerie ou en dehors, ce qui pourra être utile au moment de passer à des mesures en profondeur.

L'accès à des grandeurs quantitatives ouvre la voie à une meilleure exploitation des données dans une approche de traitement du signal. J'exploiterai particulièrement cet aspect dans ma thèse avec l'utilisation de l'imagerie de phase quantitative par interférométrie à décalage.

2.4 Apprentissage profond pour la segmentation

Au cours des dernières années, la montée en puissance de moyens de calcul informatiques et l'essor de l'apprentissage automatique, et par extension de l'apprentissage profond, a permis l'utilisation d'ordinateurs pour des tâches de calcul sur des données volumineuses de plus en plus complexes. L'apprentissage automatique permet à un ordinateur (ou système assisté par ordinateur) d'adapter ses réponses aux situations rencontrées en se fondant sur l'analyse de données empiriques passées (apprentissage). La méthodologie consiste à entraîner un modèle prédictif à partir de données pré-existantes afin de permettre à ce modèle de réaliser une prédiction sur de nouvelles données. L'évolution des modèles d'apprentissage automatique vers la modélisation des données à l'aide d'architectures articulées de différentes transformations non-linéaires est appelée apprentissage profond. On distingue plusieurs types d'apprentissage dépendant des problématiques et du type de données d'entrée que nous allons maintenant décrire.

Apprentissage supervisé

Ce type d'apprentissage implique la connaissance des objectifs à atteindre, par le biais d'annotations liées aux données d'entrée. Dans le cas d'une classification, on indiquera par exemple la ou les classes associées aux données d'entraînement. La phase d'apprentissage tend alors à lier les données d'entrée aux étiquettes associées et ainsi construire une fonction de généralisation permettant de passer des données d'entrée vers la sortie, à savoir les données d'entrées segmentées pour des tâches de segmentation.

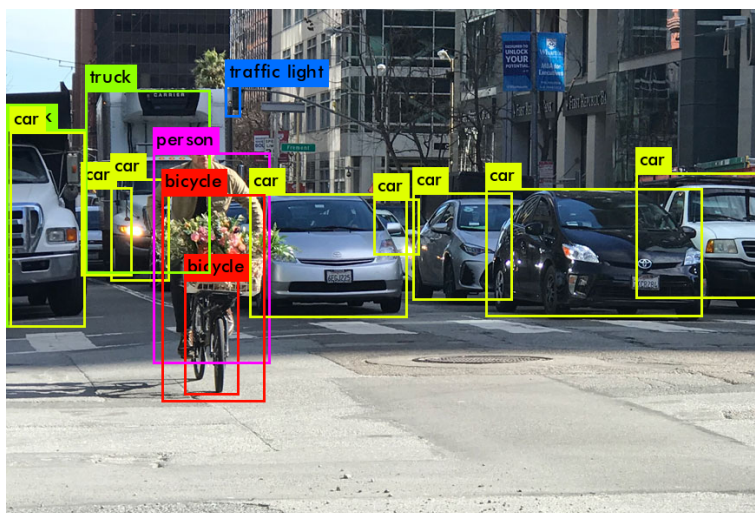


FIGURE 2.34 – Exemple d'utilisation de l'algorithme d'apprentissage supervisé *You only look once* (YOLO) (REDMON, 2016) qui segmente et classe des éléments particuliers au milieu d'une rue.

Les algorithmes d'apprentissage supervisé sont utilisés dans de nombreuses applications, comme la bioinformatique (BALDI, 2001), la reconnaissance de

langage ou la reconnaissance d'objet (Figure 2.34). Leur principal avantage réside dans la connaissance de l'objectif à atteindre et donc l'existence de métriques de caractérisation. En revanche, ils nécessitent une bonne préparation des données d'entraînement afin d'avoir un jeu de données de qualité pour éviter l'apprentissage d'erreurs et dont la taille doit être importante afin de réduire les phénomènes de sur-apprentissage.

C'est le cas de figure que nous allons exploiter au cours de cette thèse avec l'utilisation de données de microscopie de fluorescence comme annotations d'images d'intensité et de phase quantitatives.

Apprentissage non-supervisé

L'apprentissage non-supervisé (HINTON, 1999) apprend à reconnaître des motifs et structures au sein de jeux de données non anotés. On attend donc de la machine qu'elle crée elle-même les réponses grâce à différentes analyses et au classement des données. De ce fait, la plupart des algorithmes d'apprentissage non-supervisé vont être principalement utilisés pour des tâches de regroupement. Dans le cadre de la vision par ordinateur, l'apprentissage non-supervisé peut être utilisé pour des tâches de réduction de dimensions (KUMAR, 2017), de regroupement d'images (CHEN, 2005) ou encore de segmentation d'image (SONG, 2020).

Dans le cadre du traitement d'images, ces algorithmes servent principalement pour effectuer des regroupements et à trouver des structures sous-jacentes aux images. Récemment, des algorithmes ont été proposés pour réaliser de la détection de cellules sans avoir besoin d'annotations (DIN, 2021). Nous n'avons pas cherché à aller dans cette direction pendant le déroulé de cette thèse.

Apprentissage par renforcement

L'apprentissage par renforcement est un mode d'apprentissage statistique, inspiré de l'apprentissage humain et animal basé sur l'expérimentation. Lorsqu'elles ont un résultat positif et induisent des récompenses, on conclut que ces expériences sont positives et qu'elles doivent être réitérées. Au contraire, si le résultat de l'expérience n'est pas concluant, on le mémorise pour ne plus faire la même erreur. Le modèle cherche à maximiser ses récompenses. La définition donc de la mesure du résultat et des récompenses est primordiale à la définition de l'objectif à atteindre. Les applications de ces modèles sont variées et comportent entre autres l'optimisation de réactions chimiques (ZHOU, 2017), le contrôle robotique (LILLICRAP, 2019) ou encore le jeu (MNIH, 2015).

Ce type d'apprentissage concerne principalement les actions d'un agent, dans différents contextes et n'est donc pas particulièrement adapté aux problématiques de traitement d'image. Les applications possibles pour la microscopie se situent potentiellement dans le remplacement des microscopistes avec la détermination automatique des contrôles menant à l'acquisition des images (GRANTER, 2017) avec comme principaux obstacles la complexité des tâches à

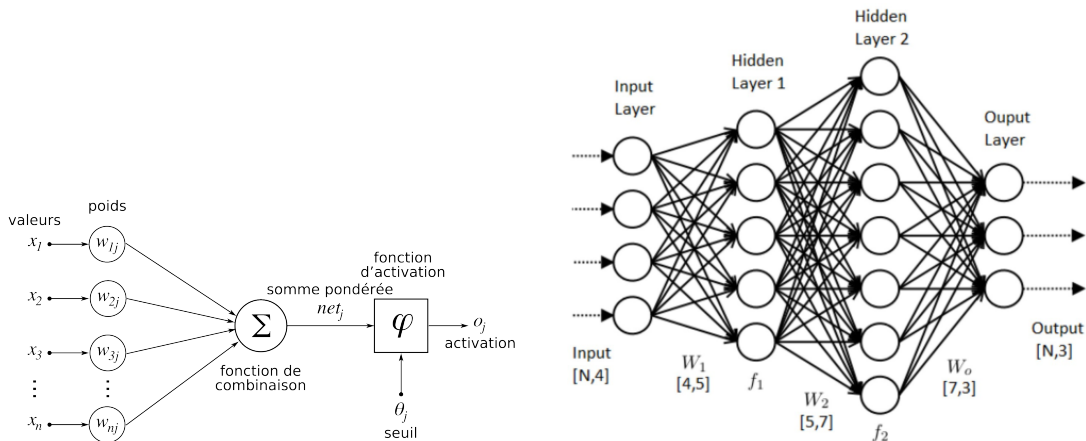
effectuer et des potentiels systèmes de récompenses à mettre en oeuvre.

Cette dernière méthode est très éloignée de ce que nous avons effectué durant cette thèse. Par la suite, je me concentrerai uniquement sur l'usage de l'apprentissage supervisé par réseaux de neurones convolutifs en microscopie de phase et d'intensité quantitative.

2.4.1 Réseaux de neurones convolutifs

Un neurone artificiel est un ensemble d'opérations mathématiques (McCulloch, 1943). Tout d'abord un poids et un biais sont appliqués de manière affine à une valeur d'entrée : en analyse d'images celle-ci est la valeur d'un pixel. Puis, une fonction d'activation est appliquée au résultat intermédiaire (Figure 2.35a). Souvent, cette fonction d'activation est non-linéaire, car elle permet de représenter des données complexes où la combinaison linéaire ne fonctionne pas. L'organisation de tels neurones artificiels en couches successives opérant en parallèle, inspirée du fonctionnement des neurones des vertébrés, est appelé réseau de neurones artificiels (Figure 2.35b) (ROSENBLATT, 1958), (RUMELHART, 1986).

FIGURE 2.35



(a) Structure d'un neurone artificiel. Le neurone calcule la somme de ses entrées x pondérée par les poids w . Cette valeur passe ensuite à travers la fonction d'activation ϕ pour produire sa sortie o . Image réalisée par Chrislb.

(b) Exemple de réseau de neurones entièrement connectés. On notera l'existence de poids et de biais à chaque jonction.

La classification d'images, et dans un sens plus large l'ensemble des problématiques d'apprentissage automatique sur des images, a connu une avancée majeure en termes de performances grâce à l'essor des réseaux de neurones convolutifs (*Convolutional Neural Network*, CNN) (KRIZHEVSKY, 2012). Le concept derrière ce type de réseau est l'utilisation de noyaux de convolution. Cela revient donc à conserver la dépendance spatiale entre les pixels et non pas à les traiter comme autant de données indépendantes. L'objectif est d'extraire des caractéristiques propres à chaque image en les compressant de manière à réduire leur taille initiale. L'image fournie en entrée passe à travers une succession de

filtres, créant des cartes de convolution. Ces cartes sont ensuite concaténées et combinées ensemble à la manière d'un réseau de neurones entièrement connecté classique. L'ajout de l'utilisation de la rétro-propagation (LECUN, 1995) a permis l'apprentissage automatique et l'ajustement des noyaux de convolutions et des poids des neurones de mise en commun (*pooling*). L'absence de paramétrage initial et d'intervention humaine est un atout majeur des réseaux de neurones convolutifs. Nous décrivons les différents éléments constitutifs des réseaux de neurones convolutifs dans la partie 3.2.2.

La reconnaissance d'images est l'une des principales applications des réseaux de neurones convolutifs. L'extraction de fonctions caractéristiques permet de détecter les éléments caractéristiques d'une image à différentes échelles. Des tâches classiques de reconnaissance d'images telles que l'étude du jeu de données *MNIST* ou le défi de reconnaissance d'images *ImageNet* ont été respectivement grandement améliorées (CIREŞAN, 2012) et remporté (KRIZHEVSKY, 2012) par des réseaux convolutifs. Parmi les autres applications des réseaux de neurones convolutifs, on notera des avancées dans la prédiction de nouvelles biomolécules candidates pour des traitements médicaux (WALLACH, 2015), l'apprentissage de jeux comme les échecs (CHELLAPILLA, 1999) ou le go (CLARK, 2015) ou encore le traitement du langage (COLLOBERT, 2011).

2.4.2 Réseaux U-net

L'étude et la segmentation des images biomédicales a mené au développement d'une architecture de réseaux de neurones convolutifs particulière, le U-net (RONNEBERGER, 2015). C'est une dérivation des réseaux entièrement connectés utilisés pour la segmentation sémantique (SHELHAMER, 2017). L'idée principale repose sur l'ajout d'une branche d'expansion située après un réseau encodeur classique et revenir en sortie à des dimensions similaires à celles de l'entrée. La branche d'expansion est plus ou moins symétrique à la branche de contraction, ce qui donne une forme de U et a ainsi donné son nom à cette architecture (Figure 2.36). Nous détaillerons plus en détail les éléments composant cette architecture et son fonctionnement dans le chapitre 3.2.2.

Le U-net est une architecture très jeune mais d'ores et déjà utilisée pour de nombreuses applications de détection d'objets, de segmentation sémantique et de segmentation d'instances, que ce soit dans le domaine des véhicules autonomes (Figure 2.34), du diagnostique bio-médical (NOVIKOV, 2018), de l'imagerie IRM pour la segmentation de tumeurs du cerveau (PRAVITASARI, 2020) ou encore de l'agriculture de précision (FAWAKHERJI, 2019).

L'une des applications particulièrement intéressantes dans le domaine de la microscopie et qui constitue une des bases de réflexion de cette thèse est la capacité à réaliser de la prédiction de fluorescence spécifique d'éléments biologiques en deux ou trois dimensions avec un apprentissage sur des images de fluorescence et une reconstitution sur des images sans marquage (piles 3D d'images d'intensité), que ce soient des images de phase (CHRISTIANSEN, 2018) (Figure 2.37) ou de microscopie électronique (OUNKOMOL, 2018).

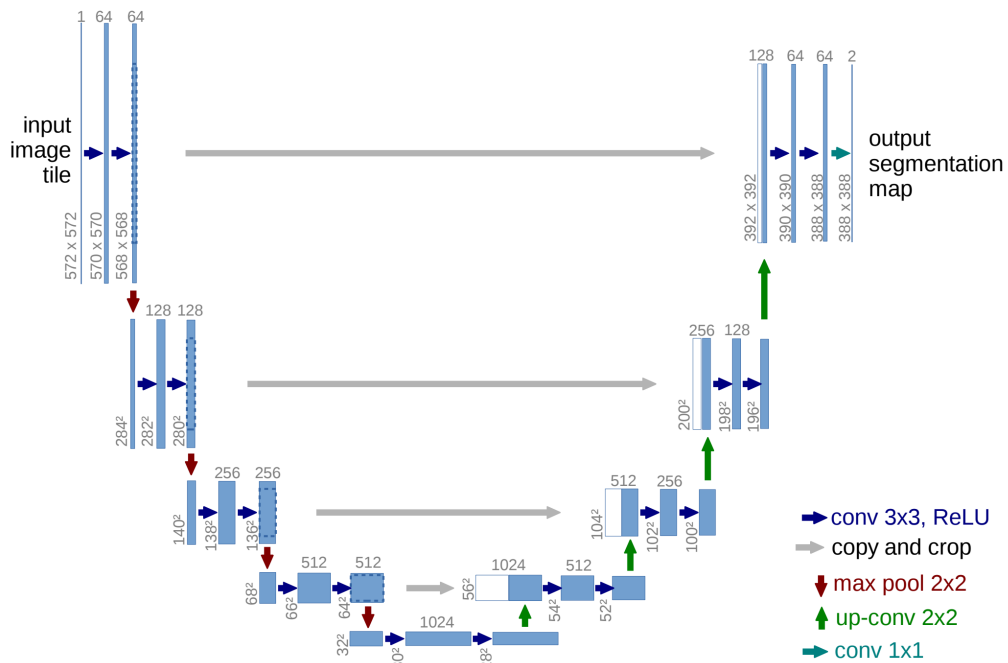


FIGURE 2.36 – Architecture U-net originelle (RONNEBERGER, 2015).

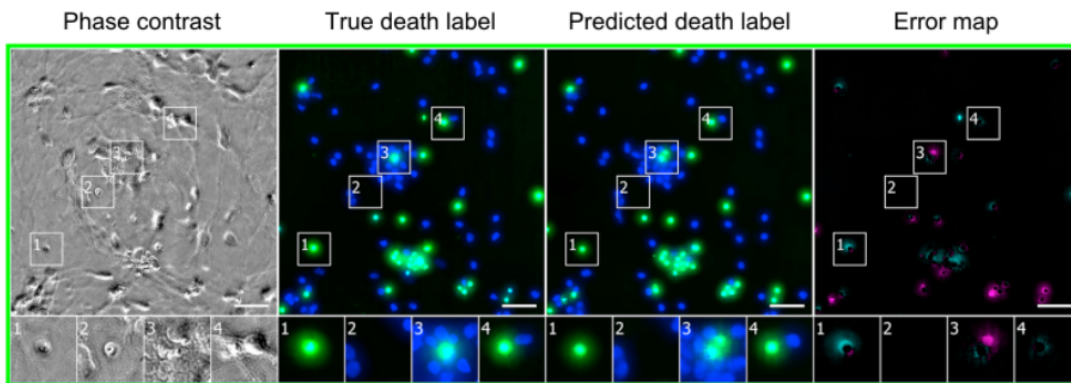


FIGURE 2.37 – Prédiction de mort cellulaire, indiquée par un marquage à l'iodure de propidium en vert. La première image est une image en contraste de phase. Les secondes et troisièmes colonnes sont respectivement la vraie fluorescence et la fluorescence prédite. La quatrième colonne représente la différence entre prédiction et vraie fluorescence, les pixels trop intenses (faux positifs) sont en magenta et ceux trop faibles (faux négatifs) sont en bleu. Les vrais (Hoechst) marqueurs nucléaires ainsi que ceux prédits ont été ajoutés en bleu pour le contexte. Échelle : 40 μ m. Figure tirée de (CHRISTIANSEN, 2018).

2.4.3 Synthèse critique

Le développement et l'utilisation d'algorithmes d'apprentissage profond ont été largement démocratisés au cours des dernières années, avec l'accès à des moyens de calcul de plus en plus importants. De nouvelles architectures de modèles sont développées afin de répondre à des problématiques spécifiques. Dans le domaine de l'imagerie biologique qui nous intéresse particulièrement, les variations de techniques et d'architectures sont très nombreuses et la plupart des recherches effectuées utilisent des modèles issus d'un tronc commun avec des petites adaptations pour coller au mieux à des problématiques particulières. Les outils d'apprentissage profond, restent néanmoins une sorte de boîte noire appliquée directement sans vraie compréhension de ses rouages dans de nombreux cas. La mise à disposition de modèles génériques tels que le U-net a cependant permis à de nombreux groupes de recherche d'accéder à ce nouvel outil très puissant.

La compréhension fine des fonctionnements des modèles nécessite cependant une expertise particulière afin de comprendre les mécanismes du bon fonctionnement des éléments constitutifs du modèle et pouvoir, le cas échéant, les modifier afin de répondre à des problématiques spécifiques. Il apparaît raisonnable de vouloir utiliser cet outil afin d'extraire un maximum d'informations des images que nous pouvons acquérir lors de nos expérimentations. Il est cependant nécessaire d'acquérir une expertise et une maîtrise de ces algorithmes complexes afin de les utiliser correctement, non plus comme une boîte noire dont on ne comprend pas les rouages, mais bien comme un outil nécessitant des réglages précis d'éléments particuliers.

2.5 Objectifs de la thèse

Le choix des techniques d'imagerie biologique repose grandement sur la réalisation de compromis entre la résolution des images, la spécificité des observations, la fréquence et le temps total d'observation ainsi que l'invasivité du système étudié. Comme les éléments biologiques que nous désirons étudier se situent à l'échelle cellulaire, les techniques de microscopie optique classiques semblent les plus appropriées. Si l'on réalise une comparaison entre les techniques de microscopie sans marquage telles que la microscopie de phase et les techniques de microscopie de fluorescence telles que l'épifluorescence ou la microscopie confocale, on peut clairement voir apparaître ces compromis (Table 2.1).

	Microscopie sans marquage	Microscopie de fluorescence
Résolution	~ 200nm	~ 200nm
Durée d'acquisition	Long	Limitée
Fréquence d'acquisition	Rapide	Limitée
Contraste	Bas	Haut
Spécificité	Faible	Forte
Traitement de l'échantillon	Aucun	Marquage de fluorescence
Type d'illumination	Champ clair peu intense	Source intense

TABLE 2.1 – Comparatif des caractéristiques des modalités d'imagerie de phase et de fluorescence.

D'un côté, pour la microscopie de phase, nous avons très peu d'invasivité sur les échantillons grâce à l'absence de marquage et à l'illumination en lumière blanche peu intense, là où la microscopie de fluorescence requiert une modification de l'échantillon en fonction des éléments à imager et l'utilisation de sources d'illumination intenses de type laser par exemple. Cette invasivité limitée lors de l'utilisation de la microscopie de phase permet également des acquisitions longues avec une illumination en continu (avec une fréquence d'acquisition limitée uniquement par la capacité d'acquisition de la caméra), alors que la microscopie de fluorescence nécessitera un compromis entre temps et fréquence d'acquisition à cause des phénomènes de photoblanchiment et de modification possible du comportement et du métabolisme liés à l'illumination (DADDYSMAN, 2014). En revanche, l'utilisation de la fluorescence permet d'obtenir des images très contrastées et de mettre en lumière de manière très spécifique des éléments particuliers, alors que les images de phase sont très peu contrastées et donc non spécifiques.

L'objectif principal de cette thèse est d'utiliser des outils d'apprentissage profond, existants ou sur mesure, afin d'entraîner des modèles prédictifs mettant en valeur et combinant les atouts de ces deux modalités de microscopie et d'arriver à extraire de la spécificité à partir d'acquisition de microscopie sans marquage. Ainsi nous aurions accès à des acquisitions non invasives à haute fréquence sur des temps longs avec un haut niveau de spécificité.

Nous possédons au sein de notre équipe de recherche une expertise dans le do-

maine de la microscopie de phase. Nos collaborateurs biologistes ont une spécialité dans la compréhension des mécanismes intra-cellulaires et dans la préparation d'échantillons pour la microscopie de fluorescence, en particulier de lignées stables présentant des niveaux d'expression homogènes et non-perturbatifs du point de vue du métabolisme cellulaire. Mon objectif premier sera donc d'acquérir une connaissance et une compréhension poussées de la mise en place et du fonctionnement des algorithmes d'apprentissage profond appliqués à la prédiction de fluorescence spécifique au sein d'images biologiques. L'idée, au cours de cette thèse, est de réaliser un mélange de ces trois aspects et de réaliser de la co-conception. Nous amenons une réflexion physique et biophysique dans le développement des algorithmes d'apprentissage profond et les éléments de pré-traitement et d'acquisition de nos images.

Chapitre 3

Deep learning sur données complexes

3.1 Acquisition des données

Mon objectif étant le développement d'outils d'apprentissage profond pour coupler la microscopie quantitative de phase et la microscopie de fluorescence, la première étape a consisté à collecter des données. La réalisation du montage expérimental et les acquisitions de données à proprement parler ont été réalisés non pas par moi mais par d'autres membres de l'équipe. Les données principales sur lesquelles nous travaillons sont des images de microscopie de phase. Mon objectif est de concevoir et d'entraîner un modèle capable de segmenter certains éléments biologiques, dans notre cas principalement des mitochondries, à partir d'images de phase. Nous avons donc besoin pour entraîner un tel modèle d'acquérir un jeu de données d'images de phase et leurs images de fluorescence associées.

3.1.1 Montage expérimental

Nous utilisons un montage classique de microscopie inversé. Pour la branche d'imagerie de phase quantitative, on utilise une illumination en lumière blanche (restreinte à 525 ± 20 nm pour ne pas exciter la fluorescence) de l'échantillon. La lumière déformée par le passage à travers le matériau biologique passe ensuite par un objectif à immersion (60x, NA=1.4, NIKON) pour obtenir un fort grandissement et une grande ouverture numérique. Elle est ensuite envoyée via un miroir dichroïque à 580nm vers d'une part (après passage par un filtre passe-long à 593nm) une caméra de fluorescence (Orca Flash 4, V2+, HAMMAMATSU) et d'autre part vers la caméra détectant la phase (Orca Flash 4, HAMMAMATSU) après passage dans le réseau de diffraction l'image d'interférence (Chapitre 2.3.5).

La branche de fluorescence utilise une illumination led (COOLLED) passant par le même objectif pour illuminer l'échantillon. L'échantillon va alors générer

un signal de fluorescence (2.2) qui va être collecté par l'objectif et être transmis par le dichroïque vers la branche de fluorescence et renvoyé puis imagé sur une caméra. Ce montage expérimental est représenté sur la figure 3.1. Cette configuration est très simple et applicable sur n'importe quel microscope de fluorescence grâce à l'ajout de la caméra de phase sur une branche et l'acquisition fluorescente sur l'autre. Il suffit alors d'acquérir pour chaque cellule ou champ étudié en simultané une image sur chaque voie pour avoir un couple d'images d'entraînement (signal et cible).

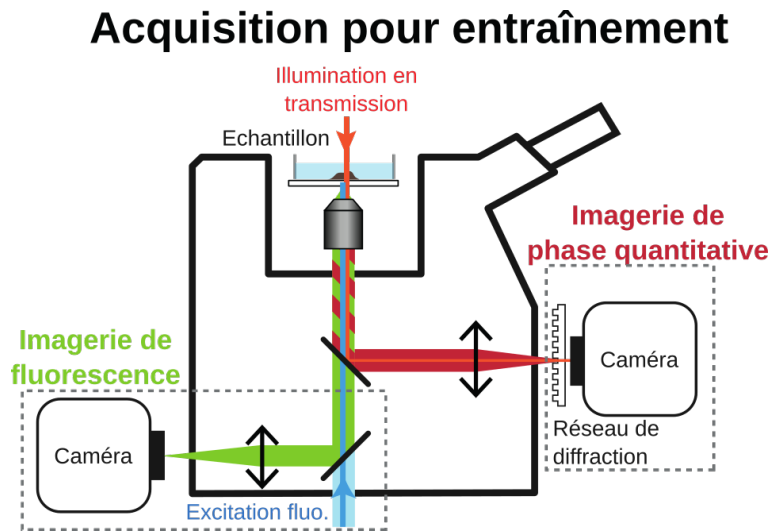


FIGURE 3.1 – Schéma du montage d'acquisition conjointe d'images de phase et de fluorescence associée. La voie rouge correspond à l'illumination champ clair et la collection par la caméra de phase. Les voies bleues et vertes correspondent respectivement à l'excitation et à la collection pour le signal de fluorescence.

Le montage à deux branches n'est nécessaire que pour l'étape d'entraînement. En effet, une fois notre modèle d'apprentissage profond entraîné, nous pouvons l'appliquer à des acquisitions de microscopie de phase seules sur des échantillons non marqués. Ceci est alors réalisable sur n'importe quel type de microscope optique avec l'ajout d'une caméra de phase (Figure 3.2). Il est cependant important d'avoir le même système optique d'imagerie (objectif et lentilles) afin d'avoir le même type d'images en sortie et donc pouvoir réaliser une prédiction précise. De même, il est préférable d'avoir une source d'illumination centrée sur la même longueur d'onde (ou assez proche) que celle utilisée pour l'entraînement, étant donné que la longueur d'onde va être utilisée pour le lien entre composantes de phase et d'intensité en complexe (Chapitre 3.3).

Dans la pratique, nous utilisons des cellules exprimant des molécules fluorescentes mCardinal ou mCherry présentant toutes deux un pic de fluorescence autour de 600nm. Ces fluorophores sont relativement photostables, ce qui permet d'effectuer une pile d'images avec un photoblanchiment limité (Chapitre 3.1.3).

Montage expérimental après entraînement

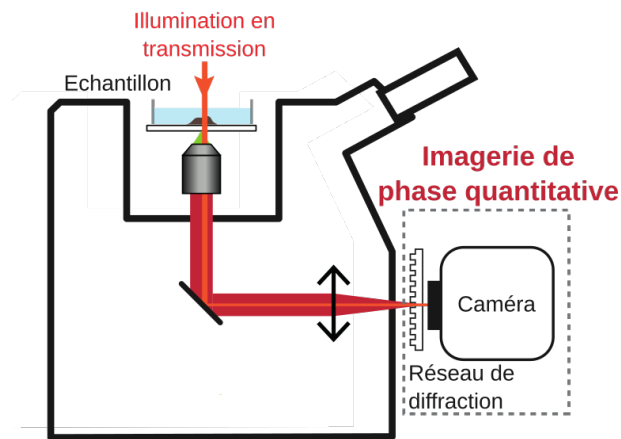


FIGURE 3.2 – Schéma du montage d'imagerie de phase quantitative seule. La voie rouge correspond à l'illumination champ clair et la collection par la caméra de phase.

3.1.2 Type de données

L'utilisation d'un masque de Hartmann modifié (PRIMOT et GUÉRINEAU, 2000) en amont du détecteur nous permet de réaliser le phénomène d'interférométrie latérale à quatre ondes (Chapitre 2.3.4). Nous collectons donc un interférogramme généré par l'auto-interférence du champ électromagnétique dans le plan d'imagerie du microscope. Un tel interférogramme permet une mesure directe de l'intensité et des gradients de différence de chemin optique d'une image (BON, MAUCORT, 2009). En intégrant numériquement les gradients de différence de chemin optique, on peut retrouver quantitativement la phase (Figure 3.3) (BON, MONNERET, 2012).

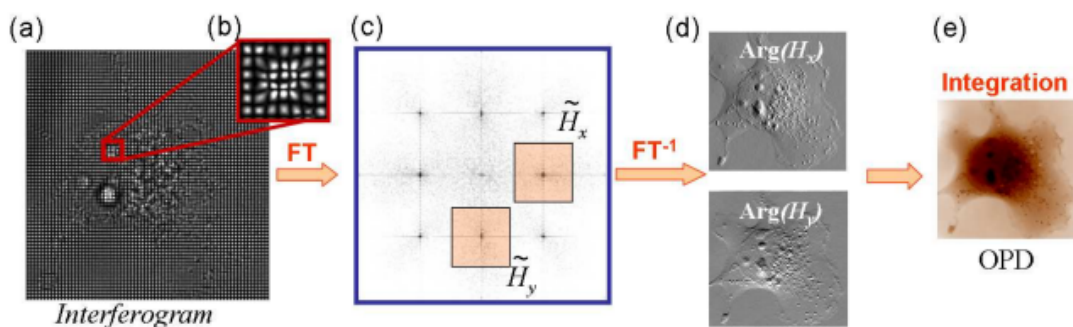


FIGURE 3.3 – Interférogramme obtenu avec un front d'onde aberrant (a). Zoom sur une partie de l'interférogramme (b). Transformée de Fourier de l'interférogramme (c). Obtention de deux gradients de différence de chemin optique orthogonaux par transformée de Fourier inverse de sous-parties (d). Intégration 2D des gradients pour reconstruire la différence de chemin optique (e). Figure tirée de (BON, MAUCORT, 2009).

L'intensité enregistrée dans le plan du détecteur est calculée telle que :

$$I(x) = \left| \frac{1}{\sqrt{2}} a\left(x - \frac{s}{2}\right) e^{ik_0 W\left(x - \frac{s}{2}\right) + ik_+^{\vec{r}} \cdot \vec{r}} + \frac{1}{\sqrt{2}} a\left(x + \frac{s}{2}\right) e^{ik_0 W\left(x + \frac{s}{2}\right) + ik_-^{\vec{r}} \cdot \vec{r}} \right|^2. \quad (3.2)$$

Avec :

- \vec{r} : le vecteur position,
- \vec{k}_+ et \vec{k}_- : les vecteurs de l'onde diffractée d'un angle ξ par le masque de Hartmann modifié comme défini dans la figure 3.4.

On peut réécrire l'équation (3.2) de la façon suivante :

$$I(x) = i_0(x) + i_x(x) \left[\begin{array}{l} e^{i(k_0[W(x - \frac{s}{2}) - W(x + \frac{s}{2}) + k_+^{\vec{r}} \cdot \vec{r} - k_-^{\vec{r}} \cdot \vec{r}])} + \\ e^{-i(k_0[W(x - \frac{s}{2}) - W(x + \frac{s}{2}) + k_+^{\vec{r}} \cdot \vec{r} - k_-^{\vec{r}} \cdot \vec{r}])} \end{array} \right] \quad (3.3)$$

Avec : $i_0(x) = [a^2(x - \frac{s}{2}) + a^2(x + \frac{s}{2})]/2$ et $i_x(x) = a(x - \frac{s}{2}) \cdot a(x + \frac{s}{2})$.

En écrivant le développement de Taylor à l'ordre 1 de la fonction W autour de la position x , on trouve l'équation suivante :

$$W(x + \epsilon) = W(x) + \epsilon \frac{\delta W}{\delta x}. \quad (3.4)$$

Avec cette approximation, l'équation (3.3) devient :

$$I(x) = i_0(x) + i_x(x) \cos \left(k_0 \left[2 \sin(\xi) x - s \frac{\delta W}{\delta x}(x) \right] \right). \quad (3.5)$$

Si on considère la loi des réseaux

$$\sin(\theta_d) - \sin(\theta_i) = \frac{p\lambda}{a}, \quad (3.6)$$

avec :

- θ_i : l'angle incident sur un réseau,
- θ_d : l'angle diffracté sur un réseau,
- λ : la longueur d'onde du faisceau,
- a : la période du réseau,
- $p \in \mathbb{Z}$,

on peut écrire les relations suivantes liant s à ξ ainsi que ξ à λ_0 et Λ :

$$s = 2z_p \tan(\xi), \quad (3.7)$$

$$\sin(\xi) = \frac{\lambda_0}{\Lambda}. \quad (3.8)$$

En combinant les deux équations (3.7) et (3.8) avec l'équation (3.5), en sachant que Λ , la période du réseau de diffraction est grande devant la longueur d'onde λ_0 , on obtient finalement l'équation de la formation de l'interférogramme en une dimension :

$$\begin{aligned} I(x) &= i_0(x) + i_x(x) \cos \left(k_0 \sin(\xi) \left[2x - \frac{2z_p}{\cos(\xi)} \frac{\delta W}{\delta x}(x) \right] \right) \\ &\approx i_0(x) + i_x(x) \cos \left(\frac{2\pi}{pas} \left[x - z_p \frac{\delta W}{\delta x}(x) \right] \right), \end{aligned} \quad (3.9)$$

avec $pas = \Lambda / 2$.

L'interférogramme obtenu lorsque la surface d'onde incidente est plane ($W = 0$) est une fonction sinusoïdale de la position x de période pas . En présence d'un élément perturbateur, l'élément biologique dans notre cas, les franges de l'interférogramme vont être déformées sous la forme d'une modulation fréquentielle autour de la fréquence principale (Figure 3.6). On peut donc extraire par démodulation autour de la fréquence $1/pas$ dans l'espace de Fourier le gradient de la surface d'onde.

L'ensemble de ces équations et calculs sont extrapolables pour un front d'onde en deux dimensions et donc pour nos mesures de différence de chemin optique introduites par le passage dans les échantillons biologiques.

Acquisition

Nous enregistrons lors de nos acquisitions des interférogrammes ainsi que des images de fluorescence. Après opérations numériques sur les interférogrammes pour l'extraction des composantes d'intensité et de phase, une étape de recalage sub-pixel entre les images phase/intensité et de fluorescence est alors effectuée pour garantir une parfaite superposition des données provenant de deux caméras distinctes. Nous obtenons les composantes de phase et d'intensité de l'imagerie en champ clair. Nous allons donc pouvoir exploiter le signal de phase en association avec la fluorescence afin d'entraîner des modèles prédictifs entre ces deux modalités. Nous verrons les résultats de ce type d'entraînements dans le chapitre 3.2.3. Dans un second temps nous utiliserons le champ magnétique complet et donc les deux composantes d'intensité et de phase en relation complexe (Chapitre 3.3.1) comme signal avec la modalité de fluorescence comme

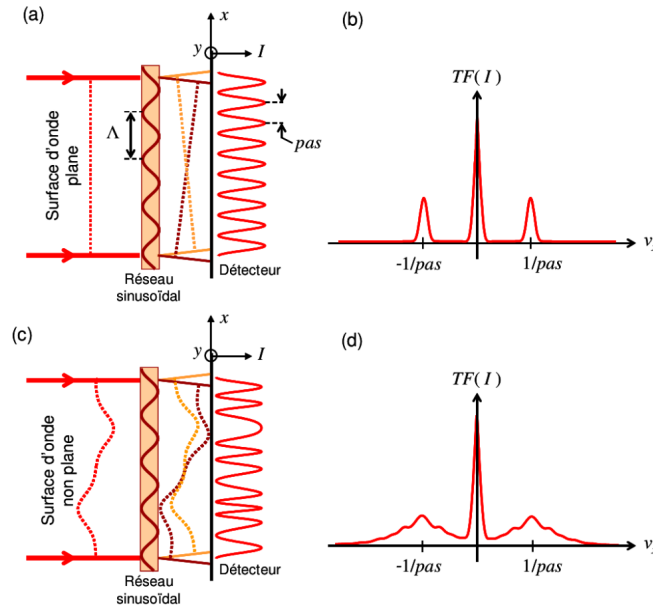


FIGURE 3.6 – Formation d'un interférogramme I en présence d'une surface d'onde plane (a). Transformée de Fourier de I pour une surface d'onde plane (b). Formation d'un interférogramme I en présence d'une surface d'onde incidente non plane (c). Transformée de Fourier de I pour la surface d'onde déformée (d).

objectif d'entraînement.

3.1.3 Échantillons biologiques

Nous réalisons nos acquisition de données sur des échantillons biologiques vivants, des cellules, afin d'étudier le comportement d'éléments intra-cellulaires particuliers (Chapitres 2.1.2 et 2.1.3). Comme nous n'avons pas d'expertise création de lignées cellulaires dans notre équipe, les cellules ont été préparées par nos collaborateurs et nous nous contentons de les cultiver et de les préparer pour l'imagerie. Nous allons décrire dans cette partie le type de cellules que nous étudions ainsi que les marquages appliqués pour la modalité de fluorescence et détaillerons les raisons des choix de ces éléments particuliers.

Cellules fibroblastes

Nous avons utilisé dans toutes nos études des cellules fibroblastes provenant de l'épiderme. Ce sont des cellules peu différenciées du tissu conjonctif. Elles sécrètent une matrice extra cellulaire souple et riche en collagène. Elles ont ainsi un rôle dans le maintien de la structure de nombreux tissus et jouent un rôle important dans la cicatrisation des plaies. Ce type de cellules est clé en imagerie biomédicale : le prélèvement s'effectuant par ponction de la peau de patients. De nombreuses pathologies et comportement cellulaires sont étudiés avec ces cellules (SORRELL, 2009). On notera également la capacité à les différencier en neurones, ce qui les rend très utiles pour l'étude des maladies neurodégénératives sur prélèvement humain.

Le grand avantage de ces cellules pour nos observations de phase réside dans leur morphologie. En effet elles sont de forme fusiforme ou étoilée, aplatie et allongée. Cette caractéristique d'aplatissement simplifie l'interprétation des images de phase en différenciant correctement les sources de retard optique (Chapitre 2.3.5). Elles ont des tailles caractéristiques de plusieurs dizaines de μm (Figure 3.7). Leur noyau est ovale et leur cytoplasme est riche en réticulum endoplasmique rugueux, ribosomes et mitochondries, ce qui les rends particulièrement intéressantes pour notre étude.

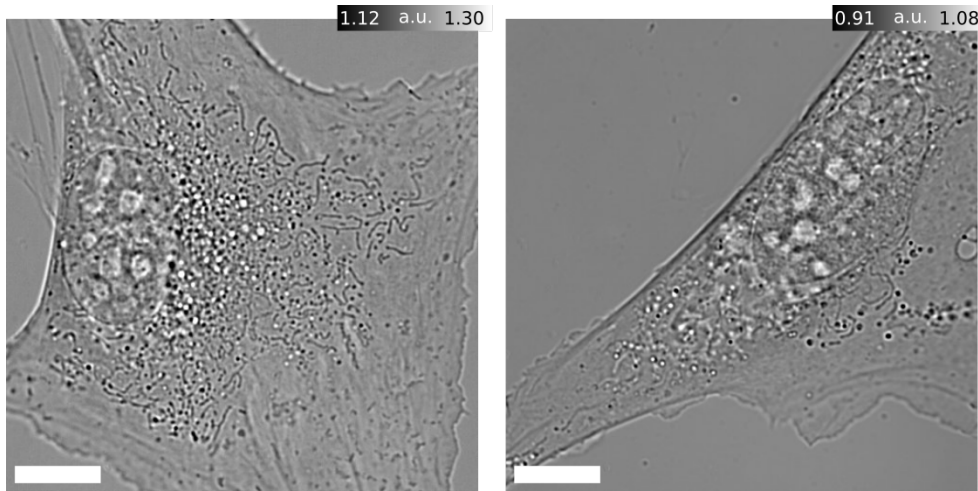


FIGURE 3.7 – Composante d'intensité d'images de phase de fibroblastes. Notons l'aspect étalé de ces cellules, les différences de morphologie entre les deux cellules ainsi que la visibilité d'organelles. Échelle : $10\mu m$.

Les cellules que nous avons utilisées pour cette étude sont des fibroblastes issus d'embryons de souris génétiquement modifiés pour exprimer les protéines fluorescentes qui nous intéressent dans les mitochondries, la membrane extérieure des mitochondries ou sur le réticulum endoplasmique.

Marquage fluorescent

Afin de pouvoir réaliser de l'imagerie de fluorescence sur des éléments particuliers à segmenter, nos cellules expriment donc des protéines fluorescentes. Le choix des fluorophores détermine les longueurs d'onde des lasers d'excitation ainsi que des filtres à utiliser dans nos montages optiques afin de ne capter que la fluorescence émise. Nous avons utilisé dans un premier temps la protéine mCardinal (CHU, 2014) qui possède une absorption entre 550 et 620nm et une émission entre 620 et 710nm (Figure 3.8). Cette protéine est dérivée de l'anémone à bouts renflés (*Entacmaea quadricolor*) et est un monomère à maturation rapide dont la sensibilité acide est modérée.

Après plusieurs expérimentations, il est apparu que les marquages en mCardinal présentait de grandes disparités d'intensité de marquage, des problèmes de stabilité et de vitesse de photoblanchiment ainsi que l'absence complète de marquage sur certaines cellules, ce qui posait de sérieux problèmes à l'algo-

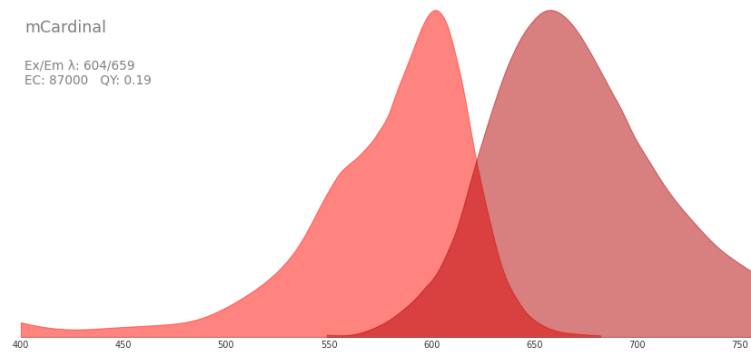


FIGURE 3.8 – Spectres d’absorption et d’émission de fluorescence de la protéine mCardinal. Image tirée de fpbase

rithme d’apprentissage. Un tri des cellules afin d’homogénéiser la population a été effectué, ce qui a grandement contribué à améliorer les résultats.

Nous avons néanmoins décidé d’essayer une autre protéine pour notre imagerie de fluorescence : la mCherry. Cette molécule est dérivée de coraux *Discosomas* (SHANER, 2004). Son absorption se situe entre 540 et 590nm et son émission est entre 560 et 650nm (Figure 3.9). Tout comme la mCardinal, cette protéine est un monomère à maturation rapide dont la sensibilité acide est modérée.

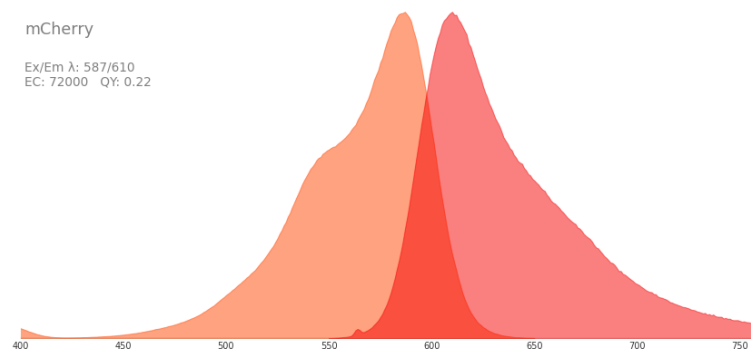


FIGURE 3.9 – Spectres d’absorption et d’émission de fluorescence de la protéine mCherry. Image tirée de fpbase.

La mCherry s’est avérée beaucoup plus stable en terme de signaux de fluorescence d’une cellule à l’autre avec un pourcentage de cellules marquées et des taux de brillance bien plus élevés que ceux de la mCardinal. De plus elle s’est également montrée plus stable dans le temps et donc plus adaptée à nos expériences. Nous avons donc décidé d’utiliser cette protéine pour l’ensemble des nos marquages afin d’avoir les mêmes longueurs d’onde de fonctionnement tout au long de nos acquisitions et ainsi de ne pas avoir à modifier notre montage optique dépendamment de l’élément biologique étudié.

3.2 Appropriation du U-net

3.2.1 Modèle initial

Dans le but de tester rapidement la pertinence de l'application d'un modèle d'apprentissage profond sur nos données de phase, j'ai décidé de partir d'un modèle déjà existant qui ne nécessiterait dans un premier temps que de faibles changements pour être applicable à nos données. L'objectif étant de réaliser de la segmentation de mitochondries à partir d'une image 2D, l'utilisation d'une architecture de type U-net a semblé le plus logique à tester.

L'explosion de l'utilisation des modèles de type U-net ces dernières années (RONNEBERGER, 2015) pour les problématiques de segmentation d'images nous offre un vivier de modèles au sein duquel trouver une base départ pour ne pas avoir à tout re-coder de zéro. Les principales différences entre ces modèles disponibles résident principalement sur trois points à balancer pour le choix de notre modèle de base :

- Le type de données en entrée et sortie.
- Les bibliothèques utilisées pour le code.
- Des petites variations dans le fonctionnement modèle.

Type de données

Les architectures de U-net disponibles sont principalement dépendantes du type de données traitées. Ainsi, leur développement a été grandement influencé par les besoins de segmentation automatique en imagerie médicale (tomodensitométrie, imagerie à résonance magnétique, imagerie à rayons X, tomographie par émissions de positons) (SHEN, 2017). D'un autre côté, la segmentation à partir d'images photographiques, que ce soit pour de la détection de routes (ZHANG, 2018) ou de la reconstruction d'images (ISOLA, 2017) a aussi contribué au développement de variations d'architectures.

En ce qui concerne l'étude de données de microscopie (MOEN, 2019), le U-net est très utile pour l'analyse de cellules uniques. Il est également utilisé pour la segmentation de données de microscopie électronique avec des possibilités de segmentation de membranes par exemple (CAO, 2020).

Librairies

Il existe de nombreuses bibliothèques Python open source dédiées au DL, chacune avec des spécificités propres. Deux d'entre elles se sont imposées chez les utilisateurs et développeurs.

- * Tensorflow¹ développé par Google Brain ainsi que sa sur-couche Keras sont actuellement les plus utilisés, notamment pour des raisons de robustesse, de nombre d'exemples disponibles et de documentation. Son

1. www.tensorflow.org

principal point négatif est le contrecoup de sa robustesse qui est une certaine rigidité des graphes et un fonctionnement optimal en production. C'est l'outil de production le plus exploité à l'heure actuelle.

- * PyTorch² développé plus récemment par les équipes de Facebook, est de son côté plus orienté recherche avec des graphes dynamiques et une facilité à implémenter et déboguer des blocs de code séparés. Son utilisation par une communauté grandissante est en train de lui faire rapidement rattraper les retards concernant la documentation et les exemples disponibles comparé à TensorFlow. Ceci couplé à une efficacité accrue lorsqu'il s'agit de réaliser des calculs accélérés sur GPU en font la librairie idéale pour le développement à tâtons inhérent aux projets de recherche.

C'est donc logiquement vers Pytorch que je me suis tourné afin de réaliser mon modèle.

Variations d'architecture

La grande majorité des modèles U-net disponibles à partir desquels j'aurai pu m'appuyer suivent l'architecture classique (Figure 3.10) développée initialement (RONNEBERGER, 2015) avec quatre couches inférieures à la couche initiale et des successions de convolution et activation répétées deux fois à chaque étage du U.

Les variations proposées à partir de ce modèle portent sur la taille des images en entrée et sortie. De même, le nombre de canaux en entrée et sortie peuvent varier. Le nombre de cartes de fonction initial peut également varier (à noter qu'on préférera des puissances de 2 pour ces valeurs dans un esprit d'uniformisation). Le choix de réaliser ou non des paddings lors des opérations de convolution permet de conserver les dimensions des cartes de fonction après les opérations de convolution et ainsi d'avoir une équivalence de taille d'image entre l'entrée et la sortie du modèle. La majorité des modèles disponibles disposent de quatre étages de profondeur comme le modèle original. Enfin les opérations de changement d'étage peuvent être des convolutions à noyaux 2x2 ou des pooling. Les principaux éléments composant le modèle U-net se retrouvent néanmoins toujours, à savoir des changement de profondeur avec réduction de taille d'image et augmentation du nombre de cartes de fonction sur la partie descendante (encodeur) et inversement sur la partie montante (décodeur) ainsi que la concaténation des données. Les architectures sont facilement modifiables et testables pour arriver vers un optimum, qu'il soit pour un cas particulier ou pour une démarche de généralisation.

Choix d'un modèle initial

Avec les différents éléments précédents en tête, nous avons cherché un modèle développé avec PyTorch, de préférence pour des données de microscopie de champ clair et ayant un potentiel de passage à la 3D. Le modèle devait également être similaire au U-net originel pour éviter de faire nos premiers tests sur

2. <https://pytorch.org>

3.2. APPROPRIATION DU U-NET

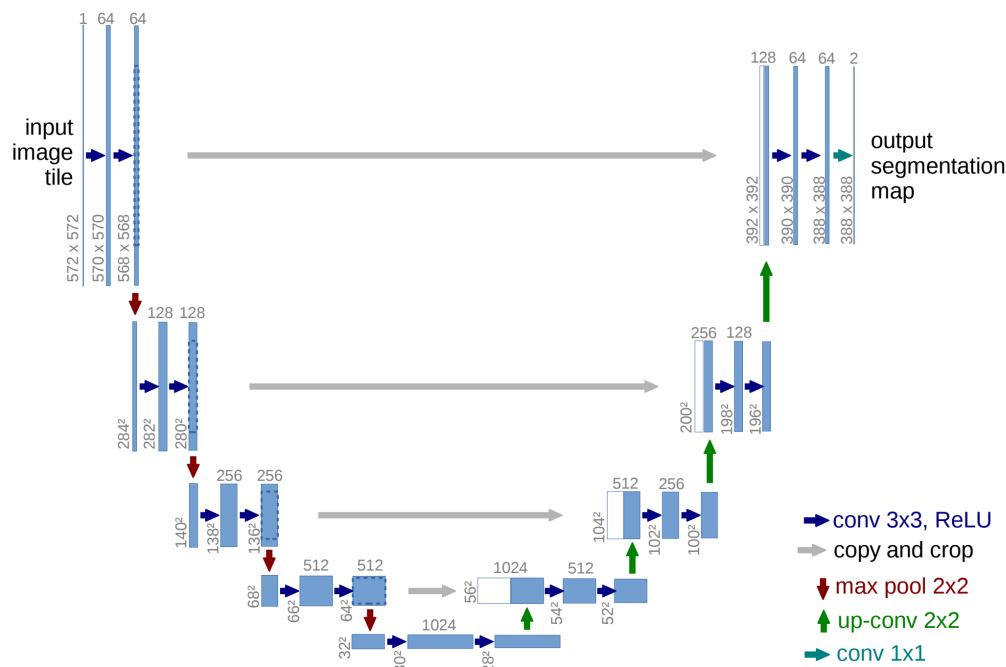


FIGURE 3.10 – Architecture U-net (RONNEBERGER, 2015). Exemple pour une résolution de 32x32 pixels au plus bas. Chaque boîte bleue correspond à une carte de fonction. Le nombre de canaux est indiqué au-dessus de la boîte. La taille x-y est indiquée dans le coin bas gauche des boîtes. Les cases blanches représentent des cartes de fonctions copiées. Les flèches représentent les différentes opérations.

une architecture qui pourrait se révéler déjà trop spécifique à une application particulière.

Nous avons donc décidé d'utiliser le modèle développé par l'équipe Allen-Cell pour leur prédiction de fluorescence à partir d'images de champ clair (OUNKOMOL, 2018). Ce modèle est développé avec PyTorch et utilise pour ses fonctions de segmentation 2D des images de microscopie électronique en entrée et leur équivalent en immunofluorescence pour l'objectif à atteindre. En 3D, les acquisitions d'entrée sont réalisées en microscopie confocale à disque rotatif, en champ clair ou DIC pour l'entrée du modèle et en fluorescence pour l'objectif à atteindre. Ce type de données se rapproche fortement des nôtres étant donné que nous désirons également réaliser un passage du champ clair vers de la fluorescence.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 3.11, l'architecture est sensiblement similaire à l'originale et les seules différences notables sont le nombre de cartes de fonction en première couche, l'ajout de normalisation par lots après les convolutions ainsi qu'un remplacement du pooling par des convolutions pour les changement de couche. Ces éléments seront détaillés plus en détail dans la section 3.2.2.

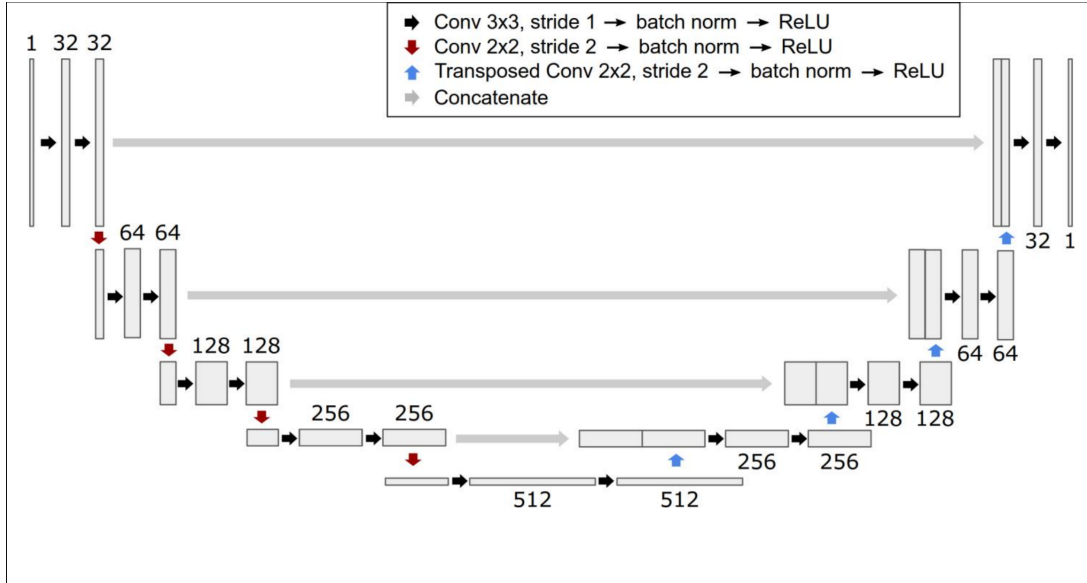


FIGURE 3.11 – Architecture du fnet de AllenCell (OUNKOMOL, 2018). Diagramme de l'architecture CNN utilisée pour leur outil. Il n'y a pas de couche de correction ni de normalisation des lots pour la dernière couche du réseau, et le nombre de cartes de fonction est indiqué au dessus de chaque élément pour chaque couche. Figure adaptée de Lecture Notes in Computer Science 234–241 (2015).

3.2.2 Fonctionnement du modèle

L'implémentation, l'utilisation efficace et, *a fortiori*, la modification de modèles d'apprentissage profond nécessitent une compréhension fine des différents éléments et opérations qui les composent ainsi que leurs séquences. Nous détaillerons dans cette partie les différents aspects du modèle que nous utilisons, avec notamment la gestion des données et la parallélisation des calculs, une description de l'architecture et des différentes opérations qui la constituent, le processus de mesure de perte ainsi que la rétro-propagation lors de la phase d'entraînement. Les différences d'utilisation entre l'entraînement et la prédiction seront également évoqués.

Gestion des données

Les données dont nous disposons pour l'apprentissage de notre modèle consistent en un jeu de données composé de paires d'images de phase et de la fluorescence équivalente. La taille classique d'un de nos jeux de données est de l'ordre de quelques centaines d'images. Ce jeu de données va être séparé en deux pour donner un jeu d'entraînement et un jeu de test. Le but de cette séparation est de cloisonner les données et d'en mettre une partie de côté qui ne sera pas du tout utilisée pendant l'entraînement et servira à caractériser le modèle entraîné. Ce cloisonnement vise principalement à éviter le phénomène de sur-apprentissage qui consiste à entraîner un modèle pour qu'il colle très bien aux données d'entraînement tout en étant très peu généralisable. Dans la pratique, on réalise une séparation avec 80% des données dans le jeu d'entraînement et 20% dans celui de test.

3.2. APPROPRIATION DU U-NET

Lors de l'apprentissage, on utilise seulement une partie de l'image appelée patch. L'étude de sous-parties de l'image plutôt que l'image entière permet la détection d'éléments fins ainsi qu'une approche plus locale de l'information. On limite également la quantité de calcul lors du passage dans le modèle. La détermination de cette taille de patch dépend des éléments que l'on souhaite segmenter ainsi que des capacités de calculs disponibles. On fait en sorte que les dimensions soient des multiples de 16 afin de pouvoir diviser facilement par deux lors de la descente dans les étages du modèle. Ces patches sont sélectionnés aléatoirement au sein de l'image. On utilisera généralement dans notre cas des tailles de 128 par 128 pixels.

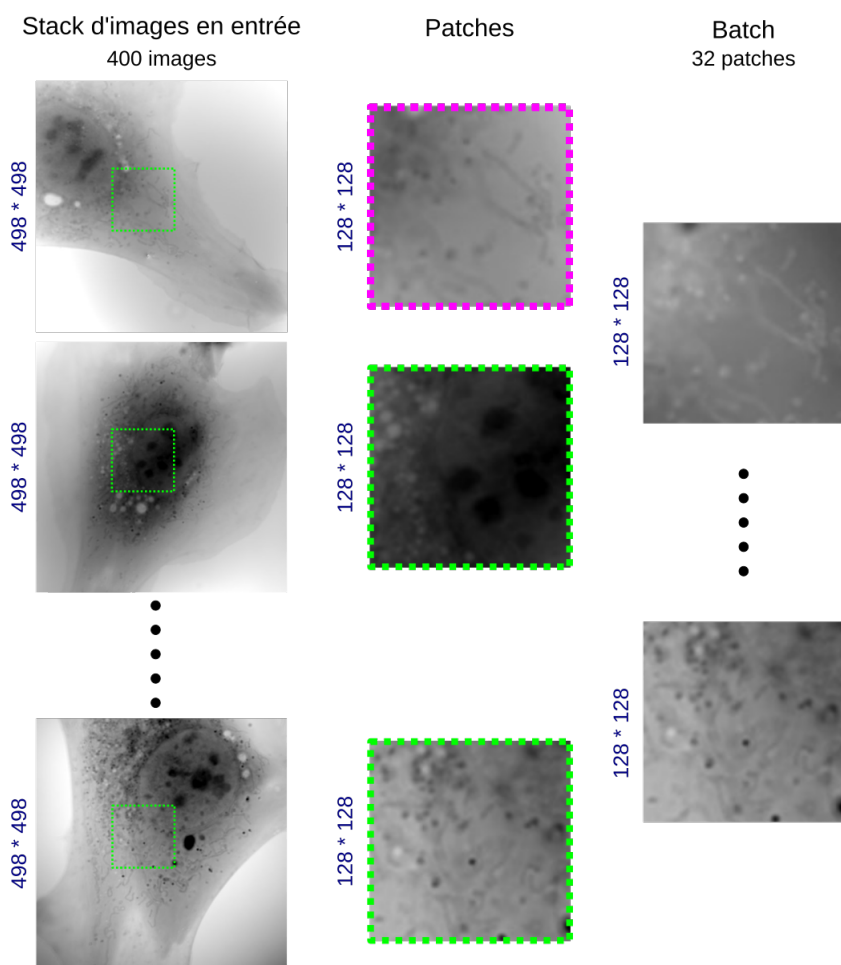


FIGURE 3.12 – Différentiation entre stack, patch et batch. On a un stack d'entraînement de 400 images de phase de 498*498 pixels. On utilise seulement un morceau de ces images à chaque fois appelé patch. Dans notre cas, il est généralement de 128*128 pixels, sélectionné aléatoirement dans l'image. On sélectionne un lot de 32 patches afin de générer un lot d'entraînement.

Afin d'accélérer le temps de calcul, on a recours à de la parallélisation des calculs, à savoir que plusieurs patches vont passer dans le modèle en même temps et être comparés à l'objectif à atteindre. L'utilisation d'une carte graphique accélère grandement la vitesse d'exécution étant donné que les cartes graphiques de dernières générations sont conçues pour paralléliser efficacement un grand

nombre de calculs grâce à des bibliothèques dédiées telles que CUDA³, une librairie développée par NVIDIA⁴ pour ses cartes graphiques. On utilise généralement des tailles de lots de 32 patches (Figure 3.12).

Entrée du modèle

Pour des raisons de facilité de description et de représentation, nous représenterons dans cette section le fonctionnement du modèle appliqué sur un seul patch. L'extension au lot complet revient juste à paralléliser les calculs sur le lot d'images. Nous injectons dans le modèle à chaque itération un batch de 32 patches de 128 par 128 pixels.

Notre image en entrée de modèle est généralement de taille 128 par 128. On la passe sous la forme d'un tenseur à 4 dimensions. La première dimension correspond aux cartes de fonction, la seconde au nombre de canaux et les deux dernières aux dimensions x et y . Comme on étudie des images à deux dimensions avec un seul canal d'informations, on a donc des tenseurs de taille $[32, 1, 128, 128]$. On garde les dimensions dont on ne se sert pas dans un souci de généralisation pour des applications futures.

Convolution

On réalise ensuite une opération de convolution par des noyaux de dimension 3 par 3 pixels et en multipliant le nombre de canaux pour avoir le nombre de cartes de fonction désiré, en l'occurrence 32 pour la première étape (Figure 3.11). La convolution est réalisée avec un padding de 1 pixel et une stride de 1 afin de conserver les dimensions en x et y .

L'opération de convolution entre une entrée de taille (N, C_{in}, H, W) et une sortie $(N, C_{out}, H_{out}, W_{out})$ est définie dans l'équation :

$$out(N_i, C_{out_j}) = bias(C_{out_j}) + \sum_{k=1}^{C_{in}-1} weight(C_{out_j}, k) \star input(N_i, k). \quad (3.10)$$

Avec :

- \star : l'opérateur de corrélation croisée,
- N : la taille de batch,
- C : le nombre de canaux,
- H : la longueur en pixel des images,
- W : la largeur en pixel des images,
- $weight$: les poids d'apprentissage, ici les valeurs du noyau de convolution,
- $bias$: le biais d'apprentissage associé au noyau.

3. <https://developer.nvidia.com/cuda-toolkit>

4. www.nvidia.com

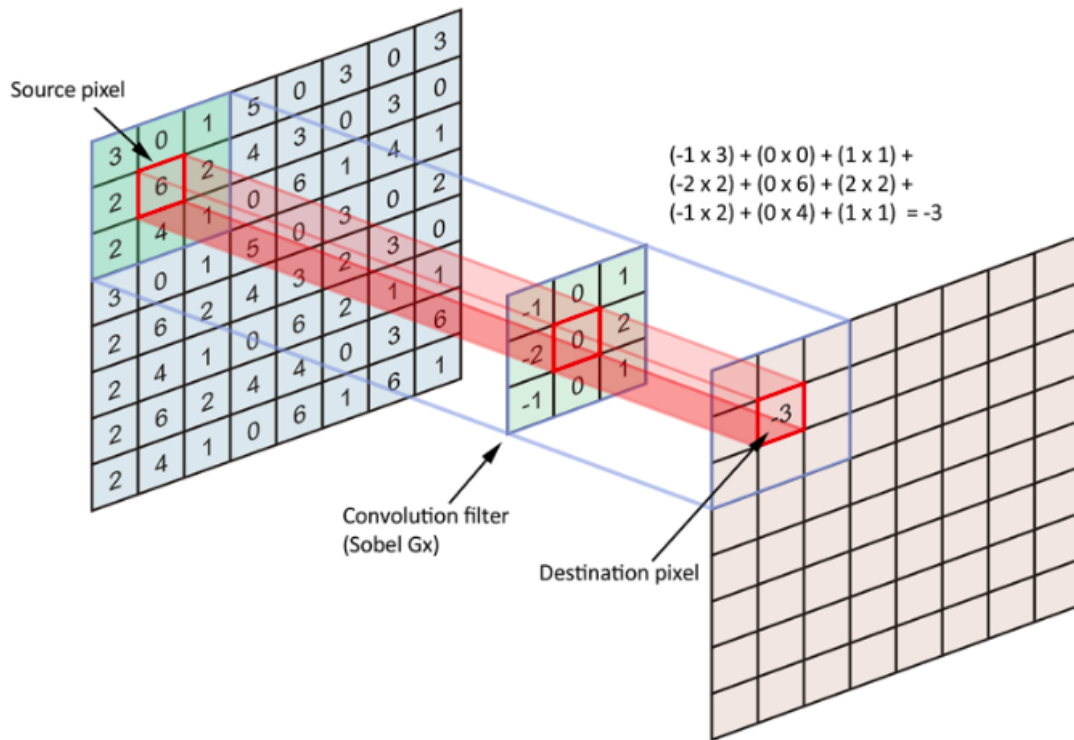


FIGURE 3.13 – Représentation graphique de l’action d’un filtre de convolution à deux dimensions de taille 3 par 3 pixels. Pour des raisons descriptives, le noyau de convolution représenté est un filtre de Sobel.

Une représentation schématique d’une opération de convolution en deux dimensions par un noyau de 3 par 3 pixels est visible sur la figure 3.13. Dans notre cas, les valeurs ne sont pas des nombres entiers. Les neuf éléments du noyau de convolution sont les paramètres qui sont ajustés au cours de l’entraînement lors de la phase de rétro-propagation (Chapitre 3.2.2) ainsi que le biais associé à ce noyau.

Normalisation par lots

On applique ensuite une opération de normalisation sur les différents éléments du lot (IOFFE, 2015) dans le but de réduire le phénomène d’*internal covariate shift*⁵. L’utilité et l’effet de ces opérations est actuellement largement discutée et critiquée. Néanmoins, dans le cadre de notre étude, nous avons décidé de la garder afin de coller aux modèles pré-existants ayant fait leurs preuves.

L’opération de normalisation est décrite dans l’équation suivante. Elle conserve les dimensions :

$$y = \frac{x - E[x]}{\sqrt{Var[x] + \epsilon}} * \gamma + \beta. \quad (3.11)$$

5. Pas de traduction officielle à ma connaissance

Avec :

- x : la couche d'entrée,
- y : la couche de sortie,
- E : l'espérance,
- Var : la variance,
- β : un coefficient entraînable initialisé à 0,
- γ : un coefficient entraînable initialisé à 1.

Fonction d'activation

Vient ensuite une opération d'activation de type Unité Linéaire Rectifiée (ReLU) (Figure 3.14) classique. Cette opération non linéaire permet de valider ou non l'effet d'un neurone (ici notre opérateur de convolution) et d'appliquer un réel changement sur les données. Son aspect différentiable est également nécessaire pour l'optimisation par gradients (SNYMAN, 2005). Elle est définie telle que :

$$ReLU(x) = (x)^+ = \text{Max}(0, x) \quad (3.12)$$

avec x la couche d'entrée.

Répétition du bloc d'opérations

La succession de l'opération de convolution, de la normalisation par lots et de la fonction d'activation représentent un bloc d'opérations que nous répétons plusieurs fois dans le modèle. Ce bloc d'opérations est représenté par les flèches noires dans la figure 3.11. On applique ce bloc d'opérations deux fois successivement sans changer les dimensions des images ni le nombre de cartes de fonction.

Convolution descendante

Toute l'ingéniosité de l'architecture U-net repose dans la détection et l'apprentissage de caractéristiques dans les images à des échelles différentes. Il est donc nécessaire de réduire les dimensions de nos images étudiées et d'apprendre de nouvelles caractéristiques sur ces images réduites, caractéristiques qui seront de fait plus globales. On réalise pour cela une opération de convolution de noyau 2 par 2 pixels avec une stride de 2, ce qui a pour effet de diviser par deux les dimensions x et y . Une représentation graphique de cette opération est visible sur la figure 3.15.

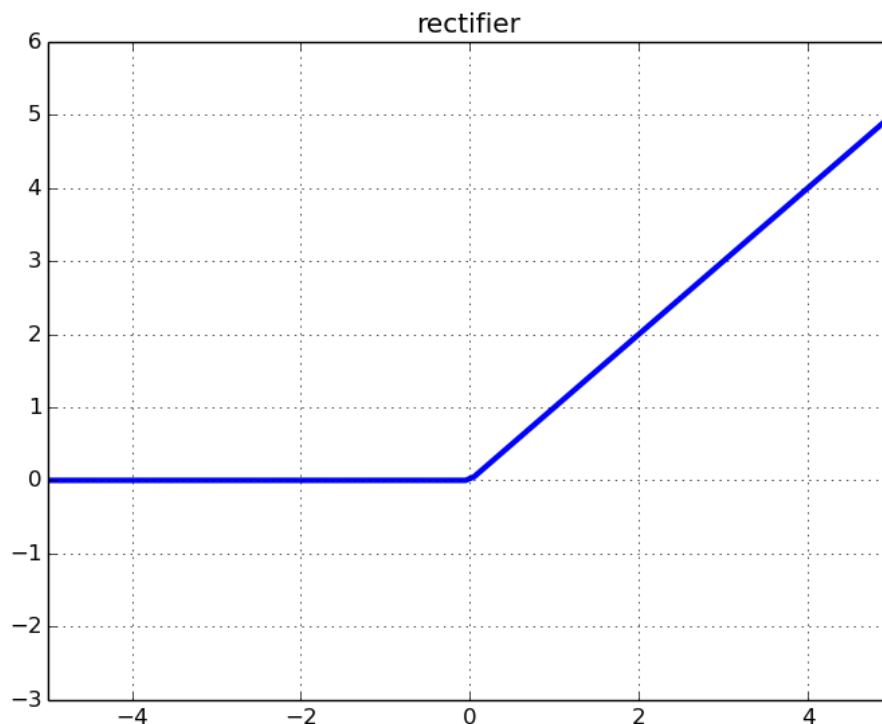


FIGURE 3.14 – Représentation graphique de la fonction d'activation ReLU.

Étages successifs

On réalise à nouveau la succession de deux blocs d'opérations complets, en prenant soin lors de la première convolution de doubler le nombre de cartes de fonction afin d'équilibrer avec la réduction de dimensions spatiales. On réalise ces opérations quatre fois au cours de la descente dans l'architecture. Cette partie réalise une fonction semblable à un encodeur classique. On a sur l'étage le plus bas des images de taille 8 par 8 pixels pour notre entrée 128 par 128 et 512 cartes de fonctions si on démarre à 32 sur la première couche.

Convolution transposée et concaténation

Pour remonter dans l'architecture, on réalise une opération de transposée de convolution avec un noyau de 2 par 2 pixels avec une stride de 2, ce qui a pour effet de multiplier les dimensions spatiales par 2. On divise également lors de cette opération le nombre de cartes de fonction par deux afin de garder une uniformité sur l'étage. Cette opération est représentée par une flèche bleue sur la figure 3.11. Une représentation graphique de cette opération est visible sur la figure 3.16.

On vient ensuite réaliser une concaténation avec les cartes de fonctions de la partie descendante de l'étage correspondant que l'on a pris soin de sauvegarder avant l'opération de descente. Cette concaténation a pour but de conserver des

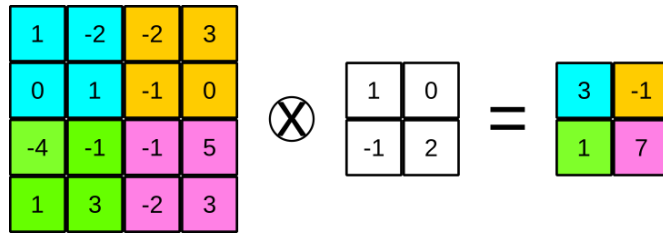


FIGURE 3.15 – Représentation graphique de la convolution descendante sur une entrée de 4 par 4 pixels. L’usage d’un noyau de 2 par 2 avec une stride de 2 permet de diviser les dimensions x et y par 2.

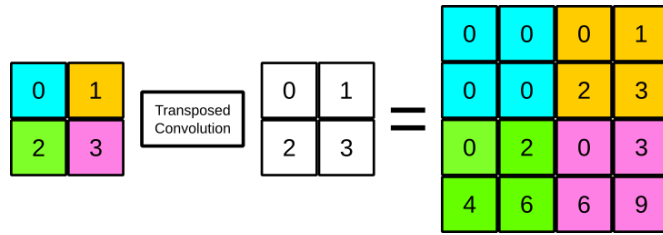


FIGURE 3.16 – Représentation graphique de la convolution transposée sur une entrée de 2 par 2 pixels. L’usage d’un noyau de 2 par 2 avec une stride de 1 permet de multiplier les dimensions x et y par 2.

informations de localisations spatiale qui sont perdues lors de l’opération de descente.

Étages successifs

On réalise à nouveau la succession de deux blocs d’opérations complets, en prenant soin cette fois-ci lors de la première convolution de diviser par deux le nombre de cartes de fonction toujours pour des raisons d’équilibrage. On réalise ces opérations quatre fois au cours de la remontée dans l’architecture. Cette partie réalise la fonction de décodeur classique. Enfin, une fois revenus à l’étage initial, on réalise une opération de convolution de sortie passant de 32 à 1 carte de fonctions afin de pouvoir comparer à l’objectif désiré, à savoir l’image de fluorescence associée.

Fonction de coût et rétro-propagation

Après le passage dans le modèle, nous obtenons un lot d’images de sortie de même taille que ceux d’entrée. Nous pouvons donc les comparer avec les patches équivalents de l’objectif à atteindre, à savoir la fluorescence dans notre cas précis. La mesure de la différence entre la sortie du modèle et l’objectif à atteindre est appelée perte et dépend d’une fonction de coût définie pour l’apprentissage. Dans notre cas, la fonction de coût est l’erreur quadratique moyenne (Mean squared error, MSE) entre les images. Elle est définie par l’équation 3.13.

$$MSE = \frac{1}{batch\ size} * \frac{1}{patch\ size} * \sum_{batch} \sum_{pixels} (Y - \tilde{Y})^2. \quad (3.13)$$

Cette fonction compare pixel à pixel l'erreur quadratique entre la sortie et l'objectif et donne la moyenne. L'objectif de l'apprentissage étant de se rapprocher le plus possible de l'objectif, on cherche à minimiser cette valeur de perte. On utilise donc un algorithme de descente de gradient (dans ce cas particulier l'optimiseur Adam (KINGMA, 2017)) afin d'ajuster les poids et biais des différents éléments du modèle ainsi que les valeurs des noyaux de convolution.

Processus d'apprentissage

Le processus d'apprentissage consiste à faire passer l'ensemble des données du jeu d'entraînement dans le modèle et de réaliser les ajustements de poids progressivement afin de converger vers une valeur de perte minimale. Comme on utilise seulement une partie des images (patches) et que l'on en fait passer plusieurs en même temps, on nomme itération le passage d'un tel lot dans le modèle suivi de la rétro propagation. On définit comme époque un nombre d'itérations correspondant au passage dans le modèle de l'ensemble des données d'entrée. On approxime la probabilité qu'un pixel soit présent dans un patch avec la formule 3.14 :

$$P = \frac{\text{patch size}}{\text{image size}}. \quad (3.14)$$

On définit une passe comme le nombre d'itérations afin d'avoir l'ensemble des images vues :

$$N_{\text{iterations par passe}} = \frac{\text{dataset size}}{\text{batch size}}. \quad (3.15)$$

On définit le nombre de passe par époque pour que la probabilité de voir chaque élément de chaque image soit supérieur à 2σ :

$$N_{\text{passe par époque}} \Rightarrow P^n < 2\sigma. \quad (3.16)$$

Ainsi on obtient le nombre d'itérations nécessaire pour avoir l'ensemble du jeu de données qui passe dans le modèle, à savoir une époque :

$$N_{\text{iterations par époque}} = N_{\text{iterations par passe}} * N_{\text{passe par époque}}. \quad (3.17)$$

Petit à petit, avec les passages répétés des images dans le modèle, les poids vont s'adapter et le modèle va converger vers un optimum. Un exemple de l'évolution de la justesse de prédiction du modèle en fonction du stade d'entraînement est visible sur la figure 3.17. Dans les premiers stades d'apprentissage, la sortie est assez proche de l'image de phase d'entrée, et avec le temps, le modèle commence à converger et à ainsi faire ressortir les mitochondries recherchées. Le modèle va ensuite s'affiner petit à petit pour améliorer la détection des éléments fins.

Il est nécessaire de bien choisir le nombre d'époques d'entraînement afin d'éviter le phénomène de sur-apprentissage qui consiste à avoir un modèle collant de très près au jeu de données d'entraînement mais peu généralisable. Ce phénomène est représenté sur la figure 3.18. Entraîner au delà du nombre d'époque optimal

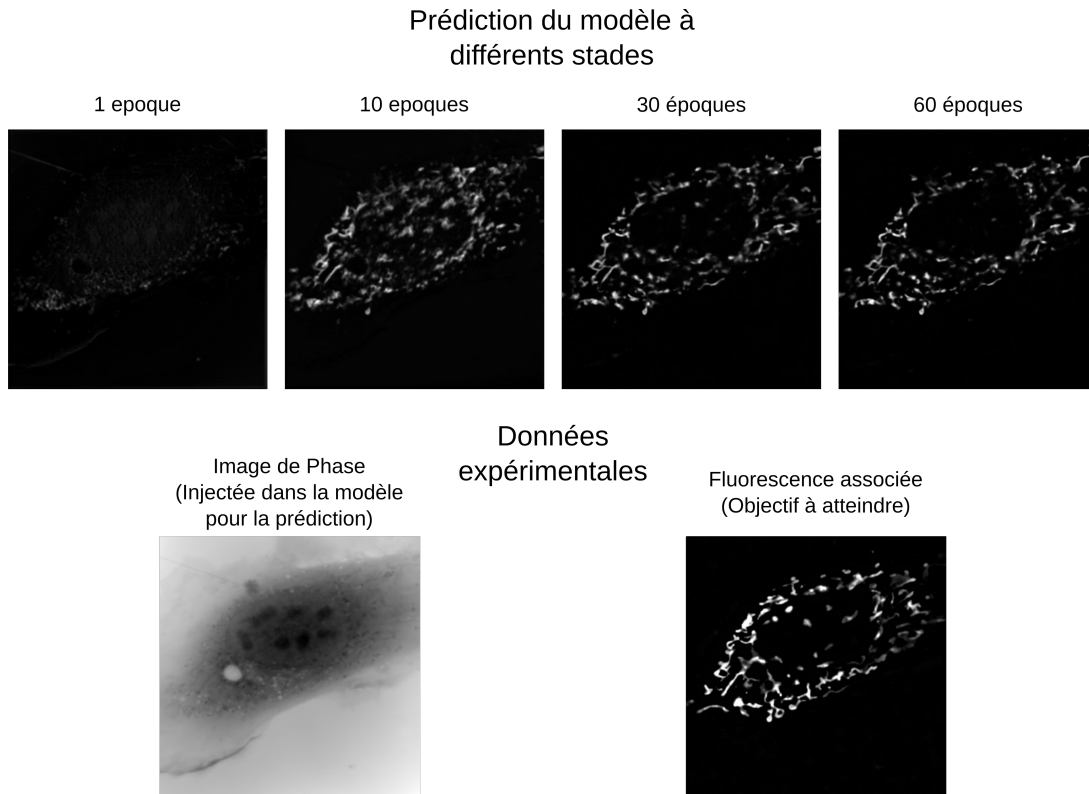


FIGURE 3.17 – Évolution des prédictions du modèle en fonction du stade d’entraînement. L’image de phase à partir de laquelle est réalisée la prédiction ainsi que la fluorescence réelle des mitochondries associée (objectif à atteindre) sont montrées pour référence.

va continuer d’améliorer la précision sur le jeu d’entraînement mais la détériorer sur les données externes et donc nuire à la généralisation. On peut utiliser pour éviter ce phénomène une interruption précoce de l’entraînement en suivant l’évolution de la précision de prédiction sur le jeu de test, ou encore mieux sur un troisième jeu de données appelé jeu de validation ayant pour seul objectif la détermination non biaisée du point d’arrêt optimal pour l’entraînement. Dans notre cas, nous avons réalisé une série de tests empiriques afin de déterminer le nombre d’époques d’entraînement optimal et ainsi l’adopter pour l’ensemble de nos entraînements et avoir une base de comparaison fixe entre les différents modèles.

Prédiction

Une fois notre modèle entraîné, nous pouvons passer à la phase de prédiction appliquée à notre jeu de données test. La prédiction consiste à faire passer une image complète à travers le modèle et à enregistrer la sortie. Pour caractériser notre modèle, on compare ensuite les prédictions avec les images de fluorescence réelle, visuellement et numériquement. A l’aide de ces caractérisations, il est possible de modifier certains paramètres d’entraînement pour chercher à améliorer la qualité de notre modèle. La qualité d’un modèle dépend de l’objectif à atteindre et l’optimisation prendra un sens différent en fonction de la complexité de la tâche à accomplir et des besoins de l’utilisateur final.

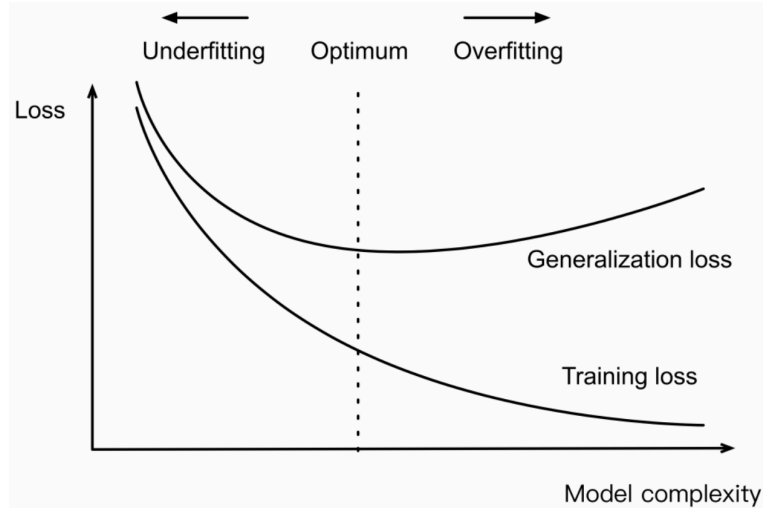


FIGURE 3.18 – Représentation du phénomène de sur-apprentissage avec l’augmentation du nombre d’époques d’entraînement. Image extraite de vitalflux.com.

3.2.3 Application à la segmentation de mitochondries depuis une image de phase

Nous avons effectué dans un premier temps un test sur des données temporelles d’une cellule fibroblaste. Nous avons réalisé l’imagerie d’une cellule pendant plus d’une heure à raison d’une image de phase par seconde. Afin de ne pas trop agresser la cellule, des acquisitions de fluorescence ont été réalisées toutes les 30 secondes pendant 40 minutes au cours de l’acquisition (Figure 3.19). Nous pouvons d’ores et déjà remarquer des zones non marquées par le fluorophore (Flèche rouge), des zones de mitochondries recourbées sur elles-mêmes (Flèche bleue) et des zones où les mitochondries sont hors du plan d’imagerie et donc floues (Flèche verte). L’objectif de ce premier essai était de voir si nous pouvions entraîner un modèle U-net capable de reconstruire la fluorescence sur l’ensemble du jeu de données à partir d’informations de fluorescence partielles, à savoir sur les images de phase sans fluorescence équivalente. La taille du jeu de données est de 3974 images de phase pour 87 images de fluorescence.

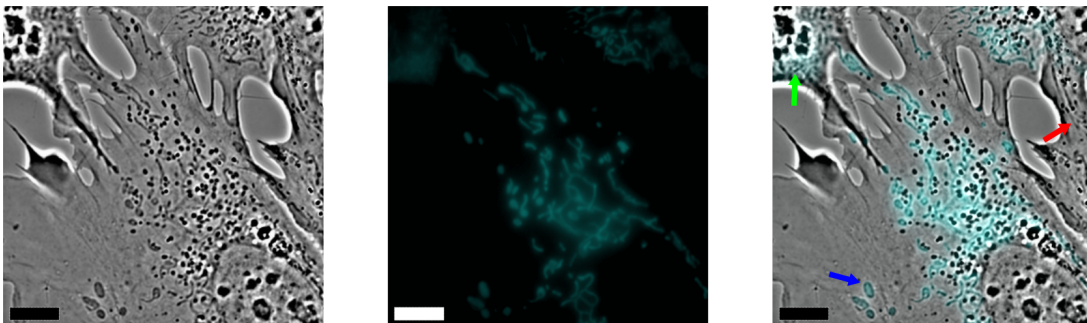


FIGURE 3.19 – Acquisition conjointe d’une image de phase et de la fluorescence associée. La composante de phase a été filtrée pour faire ressortir les éléments intéressants (a) et la fluorescence est représentée en fausse couleur (b). Un composite avec des zones notables est représenté en (c). Echelle : $10\mu m$.

L'entraînement du modèle sur les images de phase possédant une contrepartie de fluorescence a permis de reconstruire la segmentation des mitochondries sur l'ensemble des images de phase sans contrepartie. On retrouve le suivi des mitochondries dans le temps, ce qui nous permet de segmenter automatiquement et donc d'accéder à des possibilités d'analyses des dynamiques à fréquence élevée sur des temps d'acquisition longs. On se trouve néanmoins dans un cas flagrant de surentraînement comme toutes les cellules du jeu d'entraînement sont très similaire (une seule et même cellule acquise dans le temps). Ainsi, même si la plupart des mitochondries sont correctement segmentées, les zones problématiques relevées dans la figure 3.19 perdurent avec le temps, notamment l'absence de détection sur la cellule non marquée dans le champ.

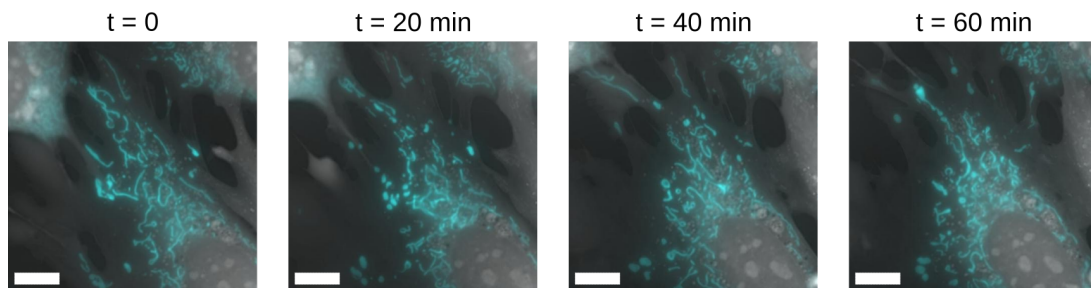


FIGURE 3.20 – Représentation de l'évolution des prédictions de fluorescence à travers le temps. Les images de phase filtrée (Noir et blanc) et de fluorescence prédites (Cyan) sont en composite. Echelle : $10\mu m$.

L'essentiel était cependant de valider la capacité d'un modèle U-net à utiliser nos données de phase pour obtenir des résultats de prédiction de fluorescence cohérents. Cet objectif a été rempli et nous permet de passer à l'étape suivante, à savoir l'utilisation du modèle sur un jeu de données de cellules uniques et surtout l'utilisation de l'ensemble des données contenues dans le champ électromagnétique recueilli par notre microscope.

3.3 Utilisation de la donnée complexe

L'utilisation du modèle U-net pré-existant sur nos données de phase donne des résultats de prédiction de segmentation de bonne qualité mais laisse toutefois une grande place à l'amélioration. Afin d'utiliser l'ensemble des informations du contenues dans le champ électromagnétique (Chapitre 3.1.2) et non plus uniquement la composante de phase, nous avons décidé de faire évoluer le modèle.

3.3.1 Intérêt de la donnée complexe

L'une des principales caractéristiques de notre technique d'imagerie de phase (Chapitre 2.3.4) réside dans la collection de l'ensemble du champ électromagnétique transmis après le passage par l'échantillon. Ainsi, le champ porte des informations sur la totalité de l'échantillon. En effet, l'imagerie d'un plan au sein de notre échantillon portera non seulement les informations de ce plan mais également des informations sur les éléments hors-focus, au-dessus et en-dessous de ce plan d'imagerie. Nous ne sommes donc théoriquement plus limités par la profondeur de champ. Cela introduit cependant des difficultés d'interprétation dans le cas d'échantillons trop épais ou chargés. Comme nous travaillons sur des cellules relativement fines, nous ne sommes pas sujets à cette limitation, et l'ensemble du signal récolté est simple à interpréter. Si on décompose le champ électromagnétique en ses composantes d'intensité (I) et la différence de chemin optique (OPD) (Chapitre 2.3.4) :

$$EM = \sqrt{I} e^{iOPD * \frac{2\pi}{\lambda}}, \quad (3.18)$$

on peut utiliser la relation complexe entre ces deux éléments et ainsi obtenir plus d'information en entrée de notre modèle et espérer une meilleure capacité de prédiction. On peut voir dans la figure 3.21 que les deux composantes portent des informations différentes et complémentaires. Utiliser ces deux composantes dans notre modèle de prédiction devient donc une source d'amélioration potentielle évidente.

3.3.2 Évolution des blocs du modèle

L'utilisation de données de type complexe dans des modèles d'apprentissage profond n'est pas très courante et réservée à des usages très spécifiques (BRUNA, 2015). De ce fait l'implémentation de ce type de données et des opérations associées dans les bibliothèques Tensorflow et Pytorch n'en est qu'à ses balbutiements. Il est donc nécessaire de réaliser des développements spécifiques de fonctions pour adapter les modèles à ces données spécifiques. L'évolution des fonctions classiques aux données complexes a été théorisée et son utilité démontrée (TRABELSI, 2018) pour des tâches basiques de vision par ordinateur. J'ai donc implémenté l'évolution des blocs de notre modèle pour les données complexes en m'appuyant sur le travail réalisé pour la bibliothèque *complexPy-*

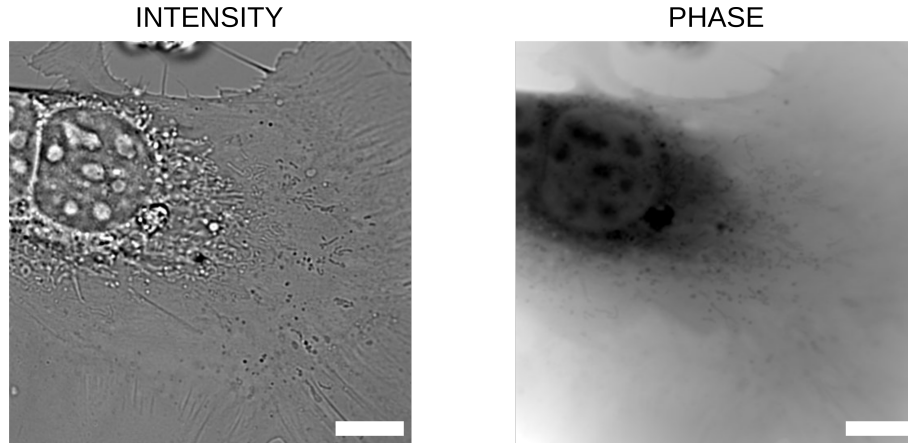


FIGURE 3.21 – Visualisation des composantes d'intensité et de phase pour une cellule fibroblaste. Echelle : 10 μ m.

*Torch*⁶ par le groupe de Sebastien Popoff. Pytorch a évolué depuis le début de mes travaux pour prendre en compte des tenseurs de type complexe. L'implémentation des blocs de calcul complexes n'a pas encore été mis en place, et seules les opérations basiques sur les tenseurs complexes sont accessibles via à la librairie. J'ai donc décidé de ne pas mettre à jour mon code pour l'utilisation de ces types de tenseurs et de rester sur une combinaison de tenseurs séparés pour les composantes réelles et imaginaires de nos données. J'envisage néanmoins fortement de faire évoluer mon code pour une intégration plus propre à la librairie Pytorch dans le futur ainsi que de contribuer au développement des fonctions de gestion des données complexes et des blocs d'opérations fréquents de la librairie.

Convolution

Le passage de l'opérateur de convolution dans le domaine complexe est réalisé par une combinaison de convolutions croisées entre les parties réelle et imaginaires du vecteur d'origine et du filtre de convolution. Comme l'opération de convolution est distributive, la convolution d'un vecteur complexe $h = x + iy$ par un filtre complexe $W = A + iB$ est définie telle que :

$$W * h = (A * x - B * y) + i(A * y + B * x). \quad (3.19)$$

Nous travaillons avec des vecteurs décomposés en parties réelle et imaginaire convolués par des filtres décomposés eux aussi en partie réelle et imaginaire. Une représentation graphique de l'opération de convolution complexe est visible sur la figure 3.22.

Normalisation par lots

Afin de transposer l'opération de normalisation par lots dans le domaine complexe, nous ne pouvons pas uniquement réaliser une translation et un redimen-

6. github.com/wavefrontshaping/complexPyTorch

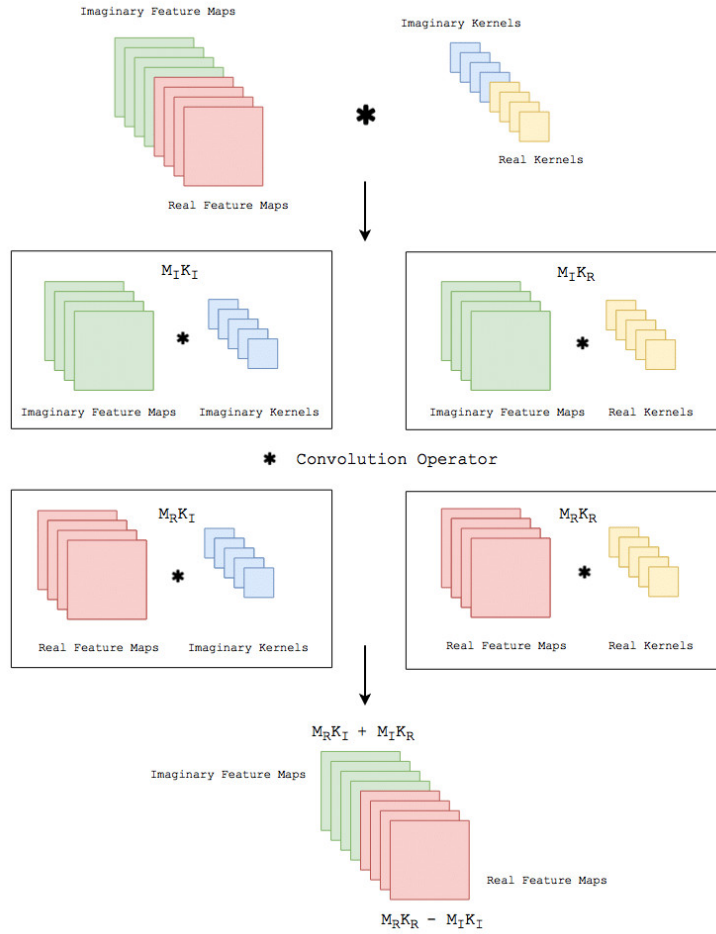


FIGURE 3.22 – Représentation graphique de l’opération de convolution complexe. On utilise les parties réelles et imaginaires des cartes de fonction (respectivement vert et rouge) et un noyau de convolution également décomposé en parties réelles et imaginaires (respectivement bleu et jaune). On applique ensuite une combinaison des convolutions classiques croisées. Figure extraite de (TRABELSI, 2018).

sionnement afin que la moyenne soit de 0 et la variance 1 comme c’est le cas pour les normalisations classiques. Cette normalisation n’assurerait pas une variance égale pour les parties réelles et imaginaires, et la distribution ne serait pas circulaire. La normalisation par lot adaptée pour notre cas aux valeurs complexes est traitée par une opération de blanchiment de concept de vecteurs 2D (HUANG, 2018). Il est nécessaire pour celà de multiplier nos données centrées en 0 ($x - \mathbb{E}[x]$) par l’inverse de la racine carrée de la matrice de covariance \mathbf{V} :

$$\tilde{x} = (\mathbf{V})^{-\frac{1}{2}} (x - \mathbb{E}[x]) \quad (3.20)$$

avec la matrice de covariance \mathbf{V} définie comme :

$$\mathbf{V} = \begin{bmatrix} V_{rr} & V_{ri} \\ V_{ir} & V_{ii} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{Cov}(\Re\{x\}, \Re\{x\}) & \text{Cov}(\Re\{x\}, \Im\{x\}) \\ \text{Cov}(\Im\{x\}, \Re\{x\}) & \text{Cov}(\Im\{x\}, \Im\{x\}) \end{bmatrix}. \quad (3.21)$$

Nous avons alors une transformation qui maintiens la moyenne de l’unité com-

plexe proche du vecteur nul, la matrice de covariance 2×2 de cette unité complexe proche de l'identité ainsi que la pseudo-covariance (également appelée matrice de relation) proche d'une matrice nulle. La moyenne, la covariance et la pseudo-covariance sont définies telles que :

$$\begin{aligned}\mu &= \mathbb{E}[\tilde{\mathbf{x}}] \\ \Gamma &= \mathbb{E}[(\tilde{\mathbf{x}} - \mu)(\tilde{\mathbf{x}} - \mu)^*] = V_{rr} + V_{ii} + i(V_{ir} - V_{ri}) \\ C &= \mathbb{E}[(\tilde{\mathbf{x}} - \mu)(\tilde{\mathbf{x}} - \mu)] = V_{rr} - V_{ii} + i(V_{ir} + V_{ri})\end{aligned}\tag{3.22}$$

Cette normalisation a pour principal intérêt de décorréler les parties réelles et imaginaires des unités complexes afin d'éviter la co-adaptation entre les deux éléments et ainsi réduire les risques de sur-apprentissage.

Fonctions d'activation

De nombreuses fonctions d'activation sont disponibles dans le domaine complexe, le plus souvent dérivées d'équivalentes du domaine réel. Dans notre cas, nous utilisons une fonction d'activation de type *ReLU* dans le domaine réel que nous allons adapter en complexe. Afin de réaliser une fonction d'activation sur les composantes réelles et imaginaires de nos vecteurs complexes, il existe principalement trois solutions :

- Une transposition directe de la *ReLU* vers le complexe, nommée *ℂReLU*, qui consiste à appliquer des *ReLU* sur les parties réelles et imaginaires séparément.
- Une fonction d'activation plus stricte nécessitant d'avoir les parties réelles et imaginaires positives en même temps pour être activée, avec une mise à 0 le reste du temps. Cette fonction est appelée *zReLU* (GUBERMAN, 2016).
- Une activation appliquée au module du nombre complexe, appelée *modReLU* comprenant une valeur seuil entraînable minimale pour l'activation, étant donné que les modules sont toujours positifs (ARJOVSKY, 2016).

Ces différentes solutions sont illustrées sur la figure 3.23. Le *modReLU* est sujet à discussions étant donné qu'il ne satisfait pas les équations de Cauchy-Riemann et n'est donc pas holomorphe, là où les deux autres, de façon similaire à la fonction d'activation *ReLU* classique, conservent une continuité de valeurs au seuil de coupure. Ajouté à cela une complexité d'implémentation ainsi qu'un temps de calcul réduits, nous avons décidé de nous concentrer sur l'utilisation de *ℂReLU* et de *zReLU* et de délaissier la troisième option.

3.3.3 Métriques d'apprentissage

La détermination de la fonction de coût à utiliser dans notre modèle a une importance toute particulière étant donné qu'elle va déterminer l'erreur entre la sortie du modèle et l'objectif à atteindre et déclencher l'ajustement des poids de ce modèle lors du processus de rétro-propagation. Le choix de cette métrique

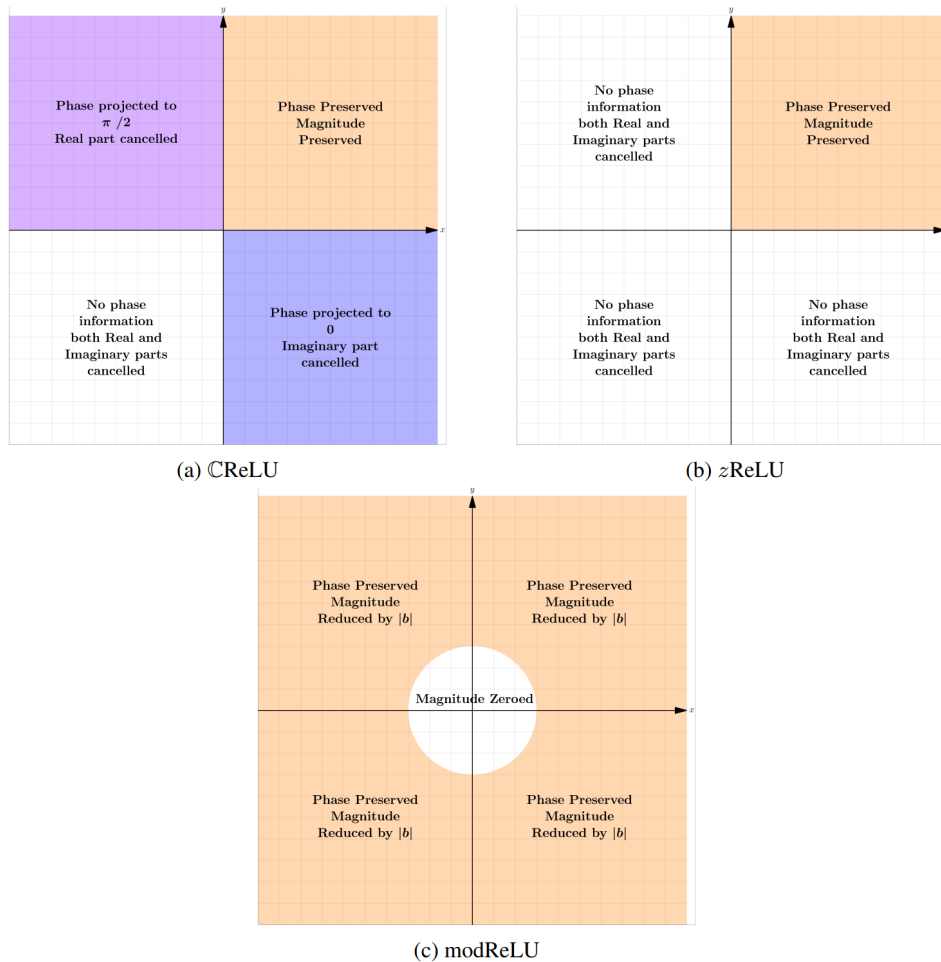


FIGURE 3.23 – Représentation graphique des différentes fonctions d'activation complexe dérivées du ReLU. Le $CReLU$ (a) coupe les valeurs négatives des deux composantes. Le $zReLU$ ne s'active que si les deux composantes sont positives (b). Le $modReLU$ coupe les valeurs dont l'amplitude est inférieure à un seuil (c). Figure extraite de (TRABELSI, 2018).

d'apprentissage est fortement dépendante du type de données étudiées et de l'objectif à atteindre. De nombreuses fonctions de coût sont disponibles dans les différentes bibliothèques, certaines générales, d'autres très spécifiques à des problématiques particulières. Nous abordons ici la métrique la plus communément utilisée pour la segmentation d'images et proposons des métriques sur mesure plus adaptées *a priori* à notre cas particulier.

Erreur quadratique moyenne

La fonction de coût la plus répandue est la fonction d'erreur quadratique moyenne, qui consiste à mesurer la moyenne des écarts quadratiques entre chaque élément de nos images de sortie et leur objectif équivalent. On compare donc chaque image du lot d'entraînement pixel à pixel avec la cible à atteindre (dans notre cas l'image de fluorescence associée) via l'équation 3.13 (Chapitre 3.2.2). Cette métrique a pour avantage de fonctionner correctement dans la plupart des cas, et d'être peu coûteuse en temps d'exécution. Son minimum

est à 0, donc l'action de la réduire le plus possible du processus d'apprentissage va directement l'améliorer. Cependant, si l'on prend un peu de recul critique, son sens physique est largement discutable. En effet elle compare les pixels deux à deux sans aucune prise en considération de l'image d'appartenance ou de l'environnement. De plus, c'est une mesure de valeur absolue qui va déséquilibrer l'impact des lots s'ils ne sont pas homogènes en terme d'intensité de signal. Nous avons donc été amenés à implémenter d'autres solutions plus cohérentes avec notre problématique.

Coefficient de Pearson

Notre objectif revenant à mesurer de la colocalisation sans être dépendant des variations d'intensités moyennes, il semblait logique de se tourner vers la mesure de corrélation en mesurant le coefficient de Pearson. Ce coefficient entre deux images est défini par l'équation suivante :

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (3.23)$$

Avec :

- x, y : les images à comparer,
- x_i, y_i : les pixels des images,
- \bar{x}, \bar{y} : les moyennes des images,
- n : le nombre de pixels par image.

Cette formule peut être réarrangée de la façon suivante :

$$r_{xy} = \frac{n \sum (x_i y_i) - \sum (x_i) \sum (y_i)}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}} \quad (3.24)$$

Ce coefficient est nul quand les deux jeux de données sont complètement décorrélés, à 1 lorsqu'ils sont parfaitement corrélés, et à -1 pour une complète anti-corrélation. Comme le processus d'apprentissage cherche à ramener la valeur de perte le plus proche possible de 0 et que nous cherchons à avoir la meilleure corrélation possible, on effectue la transformation suivante afin d'obtenir notre coût de Pearson :

$$loss = \frac{1 - r_{xy}}{2} \quad (3.25)$$

Cette nouvelle métrique nous permet de nous affranchir de nombreux problèmes liés à l'acquisition de fluorescence et à son caractère souvent inhomogène tout en présentant un coût computationnel acceptable.

3.3.4 Caractérisation

Afin de pouvoir juger de la pertinence d'un modèle, il est nécessaire d'introduire des métriques de caractérisation qui viendront rejoindre les constatations visuelles de qualité de prédiction. La qualité d'un modèle pouvant être jugée différemment en fonction de l'objectif à atteindre, il nous a semblé nécessaire de proposer un nombre élevé de moyens de caractérisations différents. Une problématique nécessitant une qualité de segmentation globale la plus haute possible ne sera pas jugée de la même façon qu'un sujet où la détection de faux positifs est rédhibitoire.

En cas d'utilisation d'une métrique donnée pour l'entraînement, le modèle étant conçu pour améliorer cette valeur, il n'est pas très bon de l'utiliser comme métrique de caractérisation. L'usage croisé entre métrique d'entraînement et métrique de caractérisation est dans ce cas bien plus adapté.

Erreur quadratique moyenne

L'erreur quadratique moyenne est la métrique d'apprentissage la plus utilisée pour faire converger des modèles, il est donc logique de pouvoir s'en servir pour caractériser des modèles, dans sa forme classique ou *via* sa racine carrée qui propose une mesure de différence directe. Je propose ici leurs valeurs généralisées à deux échantillons :

$$MSE = \mathbb{E}[(x - y)^2]. \quad (3.26)$$

$$RMSE = \sqrt{\mathbb{E}[(x - y)^2]}. \quad (3.27)$$

Coefficient de Pearson

Le coefficient de Pearson est essentiellement une mesure normalisée de la covariance entre deux échantillons. Son principal atout est de s'affranchir des valeurs moyennes des échantillons et de permettre ainsi des mesures plus justes sur des échantillons présentant des différences d'amplitude de signaux. Son équation est définie en 3.23.

Similarité structurelle

Le concept d'indice de similarité structurelle vise à reproduire le comportement humain, et extrayant les informations de luminance, contraste et structure et les recombinaison pour extraire une mesure significative (Z. WANG, 2004). Les

fonctions de comparaisons sont définies par :

$$l(x, y) = \frac{2\mu_x\mu_y + c_1}{\mu_x^2 + \mu_y^2 + c_1} \quad (3.28)$$

$$c(x, y) = \frac{2\sigma_x\sigma_y + c_2}{\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + c_2} \quad (3.29)$$

$$s(x, y) = \frac{\sigma_{xy} + c_3}{\sigma_x\sigma_y + c_3} \quad (3.30)$$

avec :

- μ_x , μ_y : les moyennes des images,
- σ_x^2 , σ_y^2 : les variances des images,
- σ_{xy} : la covariance de x et y,
- $c_1 = (k_1L)^2$, $c_2 = (k_2L)^2$: deux variables pour stabiliser les divisions à faible dénominateur,
- c_3 : variable définie à $c_2/2$,
- L : la dynamique des valeurs de pixels,
- k_1 , k_2 : deux coefficients définis par défaut à 0.01 et 0.03.

La similarité structurelle est donnée par la combinaison de ces trois éléments :

$$SSIM(x, y) = [l(x, y)]^\alpha \cdot [c(x, y)]^\beta \cdot [s(x, y)]^\gamma \quad (3.31)$$

En fixant les poids α , β et γ à 1, la formule peut être réduite à la forme suivante que nous utiliserons dans nos calculs :

$$SSIM(x, y) = \frac{(2\mu_x\mu_y + c_1)(2\sigma_{xy} + c_2)}{(\mu_x^2 + \mu_y^2 + c_1)(\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + c_2)} \quad (3.32)$$

Cette métrique nécessite cependant d'être appliquée localement puis d'être moyennée afin de mesurer les similarités locales et éviter de trop grandes disparités liées au caractère inhomogène des images.

Matrice de confusion

Une autre façon de caractériser nos résultats revient à ramener nos données sous une forme booléenne en déterminant un seuil de détection réalisant une séparation binaire entre signal et fond (Figure 3.24).

Bien que cette méthode soit plus adaptée à des problématiques de segmentation entre des classes définies, elle n'est pas inintéressante dans notre cas, notamment pour l'étude des mitochondries qui sont bien définies lors de notre imagerie. Bien qu'on perde le caractère continu de la fonction de fluorescence, cette caractérisation met en lumière de nouvelles informations qui peuvent s'avérer utiles, nous allons en lister une partie. A partir d'ici, l'ensemble des informations sont binaires et dépendent fortement du seuil de binarisation (Figure

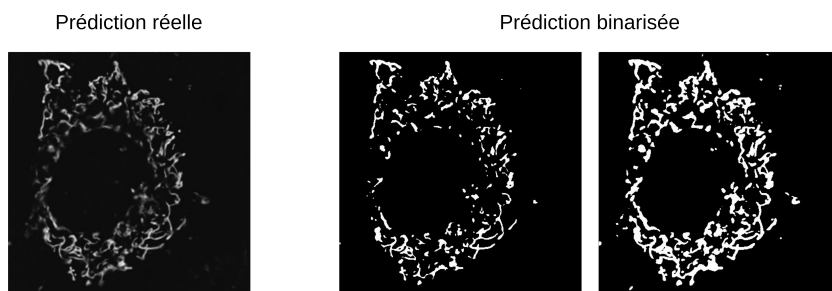


FIGURE 3.24 – Représentation de la binarisation d’une image de fluorescence. L’image originale est visible à gauche, tandis que deux résultats de binarisation avec des seuils différents.

3.24). Ce passage en binaire va débloquent de nouvelles valeurs de caractérisation. La comparaison directe pixel à pixel des images de prédiction binarisées avec les cibles équivalentes elles aussi binarisées permet la mise en lumière des faux positifs ou négatifs. On peut ainsi construire une matrice de confusion (Figure 3.25).

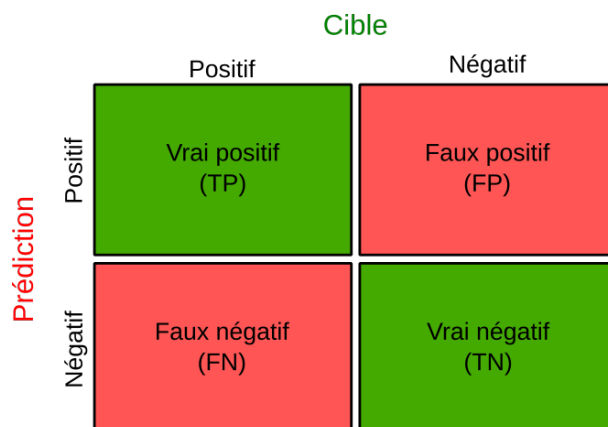


FIGURE 3.25 – Matrice de confusion entre des données prédites et l’objectif à atteindre. Les vrais positifs et négatifs constituent des prédictions correctes tandis que les faux positifs et négatifs correspondent à des erreurs de prédiction.

Coefficients de Dice et Jaccard

L’une des mesures les plus utilisées pour la comparaison de jeux de données discrètes (A, B) afin de jauger leurs similarité et diversité est l’index de Jaccard (JACCARD, 1912), et par extension le coefficient de Dice-Sørensen (DICE, 1945). L’équation de l’index Jaccard est la suivante :

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} = \frac{|A \cap B|}{|A| + |B| - |A \cap B|}. \quad (3.33)$$

Le coefficient de Dice-Sørensen est défini par :

$$DSC(A, B) = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|}. \quad (3.34)$$

Les principaux avantages de ces métriques sont une bonne gestion d'ensembles flous et une meilleure caractérisation des ensembles hétérogènes de données.

Exactitude

L'exactitude ACC correspond à la proportion d'éléments qui ont été correctement prédits, quels que soit leur classe. Elle est définie à l'aide des valeurs mesurées en 3.3.4 :

$$ACC = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}. \quad (3.35)$$

Précision et rappel

La précision PREC est la mesure de la proportion d'éléments pertinents parmi l'ensemble des éléments décelés positifs. Le rappel REC quand à lui permet de déterminer le nombre d'éléments positifs prédits comparé au nombre d'éléments positifs à trouver. Ces mesures sont définies par :

$$PREC = \frac{TP}{TP + FP}. \quad (3.36)$$

$$REC = \frac{TP}{TP + FN}. \quad (3.37)$$

Application

Dans notre cas particulier, nous pouvons choisir d'utiliser le MSE, le coefficient de Pearson et la SSIM dans les études de données biologiques bien définies telles que les mitochondries, en essayant le plus possible d'éviter de caractériser avec la même métrique que celle d'entraînement. L'utilisation des caractérisations après binarisation permet d'avoir un aperçu rapide de la qualité des modèles mais nécessite la définition d'un seuil arbitraire pour cette binarisation (usuellement 0.5). Dès lors que l'on passe à l'étude d'éléments diffus tels que le réticulum endoplasmique, il est nécessaire d'utiliser des caractérisations globales et de ce concentrer sur le coefficient de Pearson, la similarité structurelle et éventuellement les coefficients de Dice-Sørensen.

3.3.5 Conclusion

Nous avons développé un panel d'outils et d'évolutions des modèles pré-existants afin de pouvoir répondre à la problématique qui nous est propre, que ce soit pour la gestion des données, les modules de l'algorithme d'apprentissage ou encore les métriques d'apprentissages et de caractérisation. L'idée principale derrière ces développements étant l'analyse et la réflexion physique comme base de travail, et non pas des essais d'adaptation aléatoires multiples dans l'espoir de sortir une amélioration des modèles prédictifs, nous sommes convaincus que les résultats qui en découleront présenteront de réelles améliorations.

3.4 Résultats

Nous avons implémenté une évolution des modèles existants avec des modules prenant en compte la réalité physique de notre signal d'imagerie quantitative de phase et sa relation complexe. Il est maintenant nécessaire de caractériser ces développements et de déterminer leur utilité et efficacité. En effet, l'objectif des développements de nouveaux modèles consiste à trouver un compromis entre d'un côté la durée d'entraînement due à la taille et la complexité de l'architecture, et de l'autre la qualité de prédiction ainsi que le risque de sur-apprentissage. Cet arbitrage est souvent réalisé au niveau de l'utilisateur final dépendamment de ses capacités de calculs et de ses attentes en terme d'exactitude de segmentation liées au sujet étudié. Dans notre cas, l'objectif principal est l'amélioration de la segmentation. Le coût en ressources informatiques et en temps sont secondaires à nos yeux tant que leurs augmentations restent raisonnables. Un entraînement de modèle classique sur nos jeux de données typiques de quelques centaines d'images étant de l'ordre de quelques heures, on acceptera des durées d'entraînement restant dans cet ordre de grandeur.

3.4.1 Segmentation de mitochondries

Le premier et principal sujet d'analyses pour nous était l'étude des mitochondries. En effet, ces éléments ont l'avantage d'être dans la plupart des cas visibles à l'oeil nu dans nos images de phase et nous offrent donc un moyen facile de vérifier nos prédictions. De plus, c'est le sujet d'étude de nos collaborateurs biologistes, et l'étude de leur dynamique ainsi que de leur état d'oxydation est un objectif à long terme. C'est donc logiquement que nous avons testé nos évolutions de modèle sur la segmentation de ces éléments. Nous avons pour cela réalisé une acquisition conjointe d'imagerie de phase et de fluorescence associée sur un jeu de données de cellules fibroblastes possédant un marquage des mitochondries pour la fluorescence. Nous avons ainsi récupéré d'un côté les composantes d'intensité et de phase de notre imagerie quantitative de phase, et de l'autre les images de fluorescence associées (Figure 3.26).

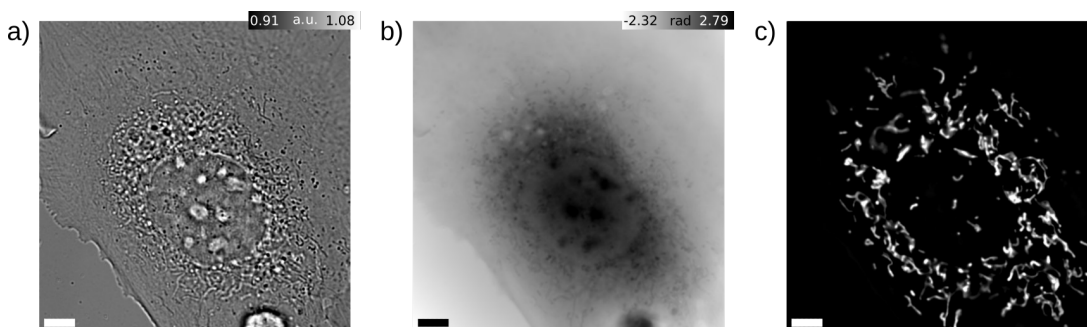


FIGURE 3.26 – Exemple d'acquisition pour une cellule du jeu de données complexe. Acquisition conjointe du champ électromagnétique dont sont extraits les composantes d'intensité a) et de phase b), et de la fluorescence associée c). Échelle : $5\mu m$.

On remarque sur les images d'intensité et de phase que certains éléments cel-

lulaires sont visibles et segmentables à l'oeil nu. En ce qui concerne l'acquisition de fluorescence, on peut voir que l'intensité du signal et la netteté des mitochondries est variable et dépend de la position en profondeur de la mitochondrie. Le plan d'acquisition ayant été choisi comme plan d'imagerie optimal pour la plupart des mitochondries, un peu au dessus de la lamelle pour nos acquisitions sur cellules plates, la plupart des mitochondries sont correctement imagées. Cependant on voit également que certaines ont un signal plus faible et des contours moins nets indiquant une présence dans un plan différent. L'objet de notre passage en complexe est principalement la possibilité de détecter l'ensemble de ces mitochondries et ainsi coller le plus possible à l'objectif lors de notre prédiction.

La description complexe du champ électromagnétique 3.3.1 implique l'utilisation de l'exponentielle de la composante de phase ainsi qu'un équilibrage entre les deux composantes.

$$EM = \sqrt{I} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} OPD} \quad (3.38)$$

Dans notre cas particulier, nous avons décidé d'utiliser la forme logarithmique de cette équation pour éviter les phénomènes de recouvrement de phase.

$$\frac{\lambda}{4\pi} \ln(I) + iOPD \quad (3.39)$$

Nous avons donc une utilisation des deux composantes, d'intensité et de phase, liées de façon complexe pour coller à la théorie du champ électromagnétique, comme entrée de notre modèle d'apprentissage U-net modifié.

Après entraînement du modèle sur notre jeu de données expérimental, nous obtenons des résultats de prédiction très proches de la cible de fluorescence à atteindre. Ces résultats sont illustrés sur la figure 3.27.

Nous avons ensuite caractérisé ce nouveau modèle complexe à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson (Chapitre 3.3.4). Les résultats sont représentés sur la figure 3.28. Nous pouvons voir une corrélation très bonne qui correspond à l'analyse visuelle que nous avons pu avoir sur la qualité des prédictions de ce modèle.

3.4. RÉSULTATS

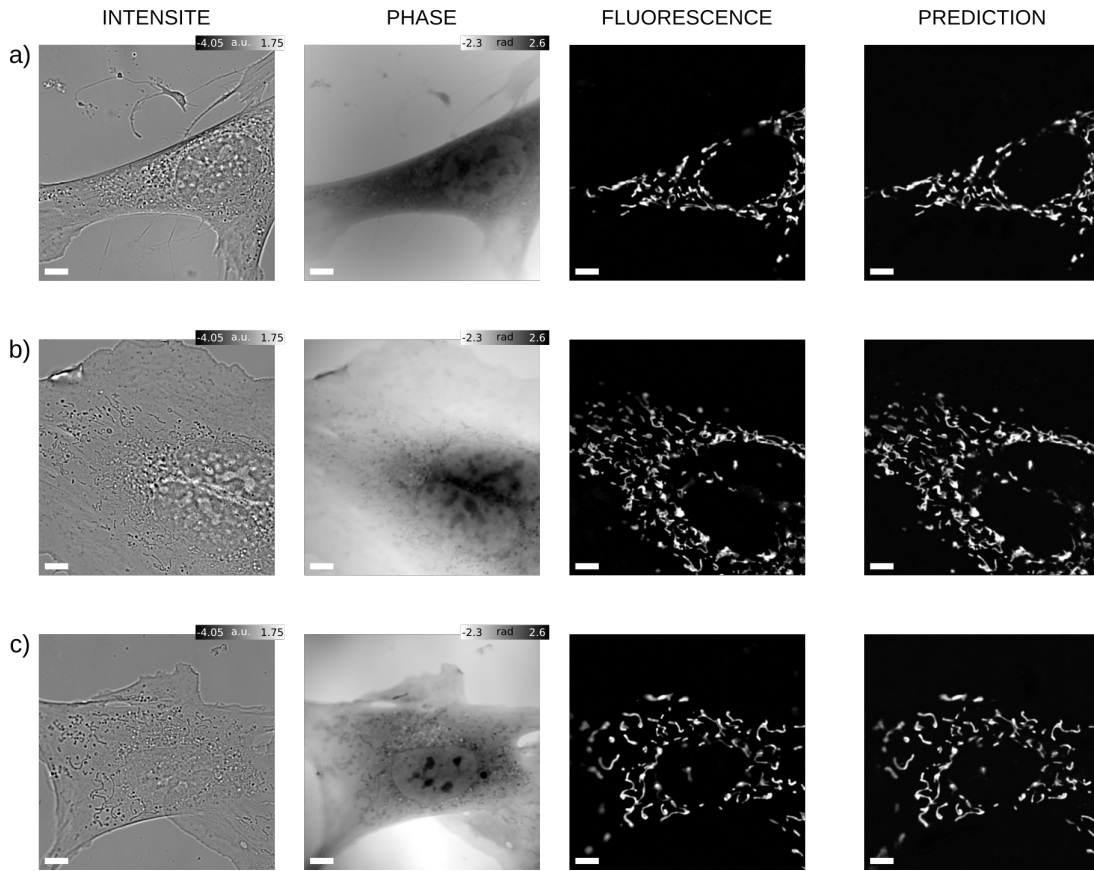


FIGURE 3.27 – Résultats d'un entraînement utilisant des données complexes en entrée pour de la prédiction de fluorescence sur mitochondries. Échelle : $5\mu m$

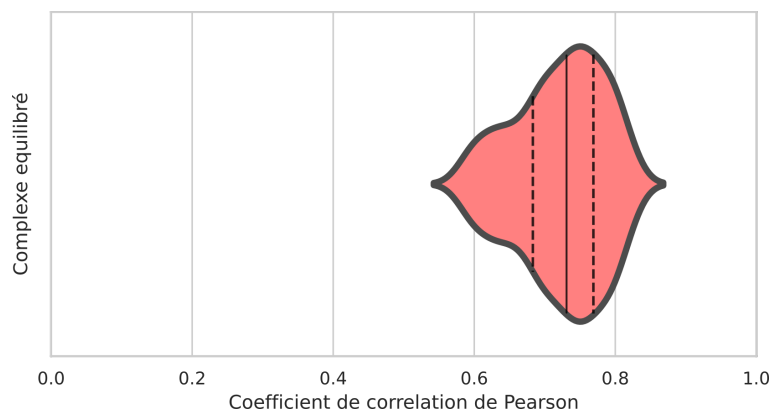


FIGURE 3.28 – Distribution des coefficients de corrélation entre les images prédites par le modèle entraîné avec le champ complexe équilibré en entrée. Représentation de la distribution excluant les 5% d'extrêmes. La moyenne et les quartiles sont représentés.

3.4.2 Comparaison entre différents modèles

Maintenant que le fonctionnement de notre modèle sur données complexes donne des résultats corrects, il est nécessaire de valider ou non une amélioration par rapport aux modèles précédents. En effet, la prise en compte des données complexes et l'introduction des blocs de calcul associés a généré une augmentation de la charge de calcul et donc du temps d'entraînement. Ainsi, si le gain introduit par cette utilisation des valeurs complexes est négligeable ou si on s'aperçoit que les prédictions sont en fait détériorées, nous devons abandonner cette solution. Nous avons donc décidé de la comparer avec des modèles entraînés :

- sur la composante d'intensité seule,
- sur la composante de phase seule comme vu au chapitre 3.2.3,
- sur les deux composantes d'intensité et de phase utilisées comme deux canaux d'entrées réelles,
- sur les composantes d'intensité et de phase reliés de façon complexe sans équilibrage.

Afin d'avoir la meilleure comparaison possible entre ces différents entraînements, ils ont tous été réalisés sur les mêmes jeux de données avec les mêmes hyperparamètres d'entraînement. Les seules différences entre les entraînements résident sur l'utilisation ou non du modèle complexe et sur les composantes du champ électromagnétique que nous utilisons en entrée des modèles. Nous avons également réalisé différentes séparations aléatoires entre jeux de données d'entraînement et de test afin de vérifier que cette séparation n'influe pas statistiquement sur les résultats de l'entraînement.

Intensité seule

La composante d'intensité n'est généralement pas l'image que l'on préfère étudier lors de l'imagerie de phase. En effet, lorsque nous sommes dans le plan d'imagerie optimal, c'est la composante de phase qui porte le maximum d'informations. Néanmoins, cette composante présente un intérêt certain et permet déjà à l'oeil nu de détecter des éléments particuliers de la cellule (Figure 3.29). Certains éléments épais, telles que des vésicules sont donc aisément visibles et pourront ressortir d'un modèle prédictif. Certains éléments en dessous ou au dessus du plan d'imagerie ressortent également sur cette composante, y compris des mitochondries, ce qui présente un intérêt certain pour notre étude.

L'entraînement arrive à mettre en lumière certains éléments reconstruits correctement (Figure 3.30), mais on peut clairement voir que de nombreuses zones sont difficilement reconstruites, notamment lorsqu'elles sont chargées en information. Certaines mitochondries sont également complètement absentes de la prédiction, alors même qu'elles sont isolées et facilement détectables à l'oeil nu sur la composante de phase et présentes dans le plan d'imagerie. La qualité de reconstruction, bien qu'acceptable et mettant en valeur certaines zones particulières, est à première vue moins bonne que pour notre modèle entraîné avec

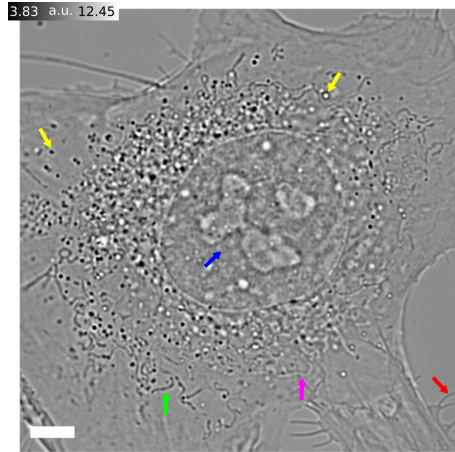


FIGURE 3.29 – Composante d'intensité d'une cellule fibroblaste. On peut détecter à l'oeil nu des éléments spécifiques tels que le noyau (bleu), des filopodes (rouge) ou des vésicules (jaune) dans différents plans. On peut également voir des mitochondries dans le plan d'imagerie (vert) ou en dessous de ce plan (violet). Échelle : $5\mu m$.

la composante complexe. On notera particulièrement des difficultés de reconstruction dans les zones denses de la cellule et une perte de finesse globale pour les mitochondries correctement segmentées.

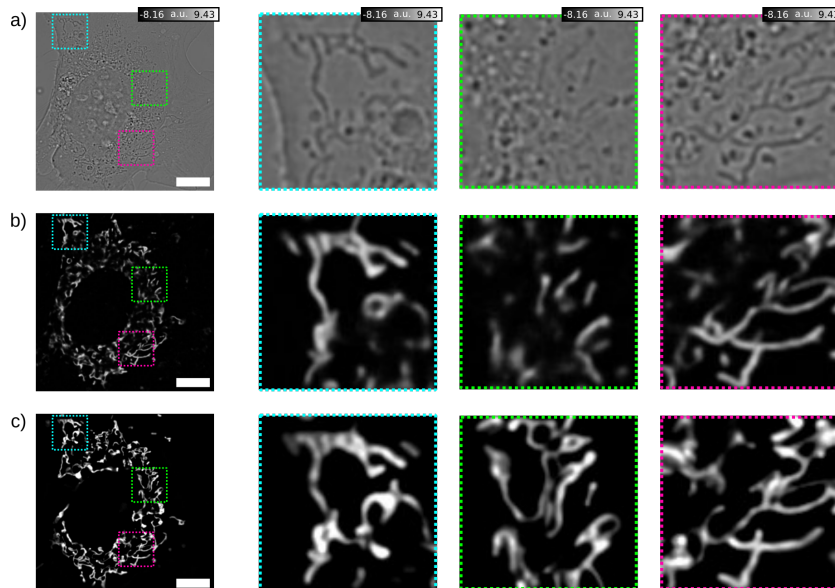


FIGURE 3.30 – Prédiction sur modèle entraîné à partir du signal d'intensité seul d'une cellule. Représentation et zooms du signal d'entrée a), de la prédiction du modèle b) et de la ground truth c). Échelle : $10\mu m$.

Après avoir entraîné notre modèle avec comme métrique l'erreur quadratique moyenne (Chapitre 3.3.3), nous avons choisi de le caractériser avec le coefficient de corrélation de Pearson. On peut voir sur la figure 3.31 la représentation des coefficients de corrélation de Pearson pour les images issues du jeu de données de test. On notera une grande dispersion des valeurs en fonction des images étudiées et un coefficient de corrélation moyen autour de 0.5, ce qui n'est pas

vraiment satisfaisant dans notre cas et loin des valeurs obtenues en complexe.

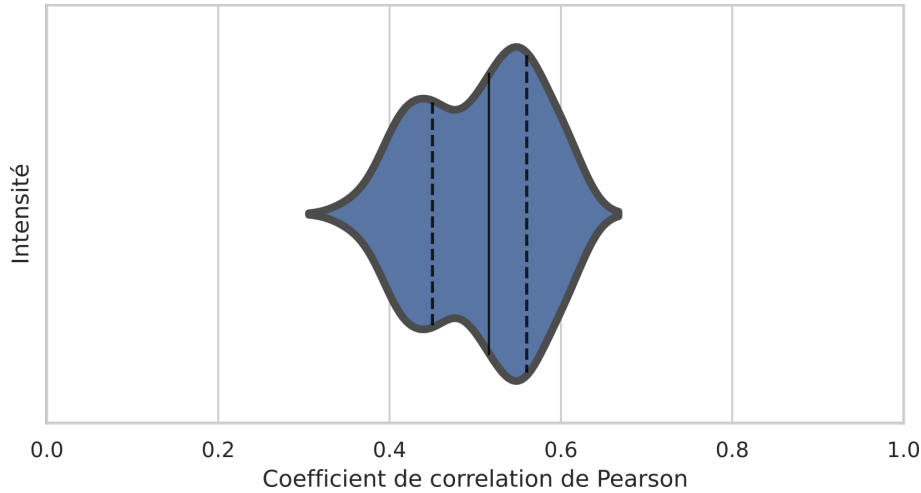


FIGURE 3.31 – Distribution des coefficients de corrélation entre les images prédites par le modèle entraîné avec la composante d'intensité seule. Représentation de la distribution excluant les 5% d'extrêmes. La moyenne et les quartiles sont représentés.

Phase seule

L'utilisation de la composante de phase seule est le premier test que nous avons fait lors de la prise en main de l'architecture et de l'appropriation du modèle U-net (Chapitre 3.2.3). Les résultats étaient alors satisfaisants mais nous ont poussé à creuser les possibilités d'amélioration en utilisant le signal complexe dans son ensemble. Cette composante porte un maximum d'informations sur le plan d'imagerie et permet de détecter sans problème les mitochondries à l'oeil nu, même dans des zones assez denses (Figure 3.32). La majorité des éléments situés en dehors du plan d'imagerie que nous pouvions voir précédemment sur les images d'intensité ne sont plus visibles, seules les informations présentes dans le plan d'imagerie ressortent.

Il est donc attendu que le modèle réussisse à segmenter correctement les éléments du plan d'imagerie après entraînement. On peut voir que le modèle arrive à prédire la localisation des mitochondries de manière relativement précise dans les zones de périphérie, où elles sont clairement visibles à l'oeil nu, mais également dans les zones plus denses (Figure 3.33). On notera cependant de la perte de qualité dans certains cas avec plusieurs mitochondries qui ne sont pas reconstruites entièrement. On peut supposer que ces mitochondries ne sont pas entièrement présentes dans le plan d'imagerie, et donc pas entièrement reconstruites par notre modèle. On notera cependant une amélioration globale de la netteté et de la finesse de reconstruction des éléments fins, y compris proche du noyau.

On peut voir sur la caractérisation par coefficient de corrélation de Pearson (Figure 3.34) que les valeurs sont meilleures que pour le modèle entraîné avec

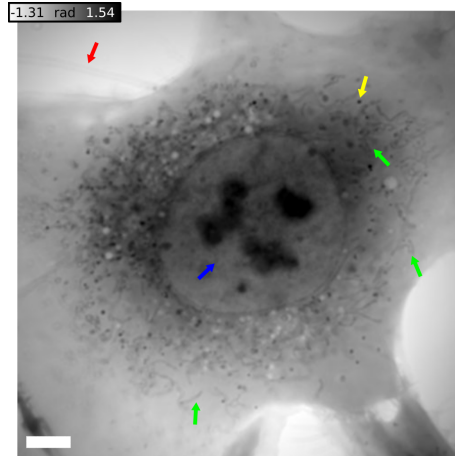


FIGURE 3.32 – Composante de phase d’une cellule fibroblaste. On peut détecter à l’oeil nu des éléments spécifiques tels que le noyau (bleu), certains filopodes hors focus (rouge) ou des vésicules (jaune). On peut également voir des mitochondries dans le plan d’imagerie (vert). Échelle : $5\mu m$.

les composantes d’intensité seules (Figure 3.31), ce qui était attendu vu que la composante de phase porte la majorité des informations du plan d’imagerie.

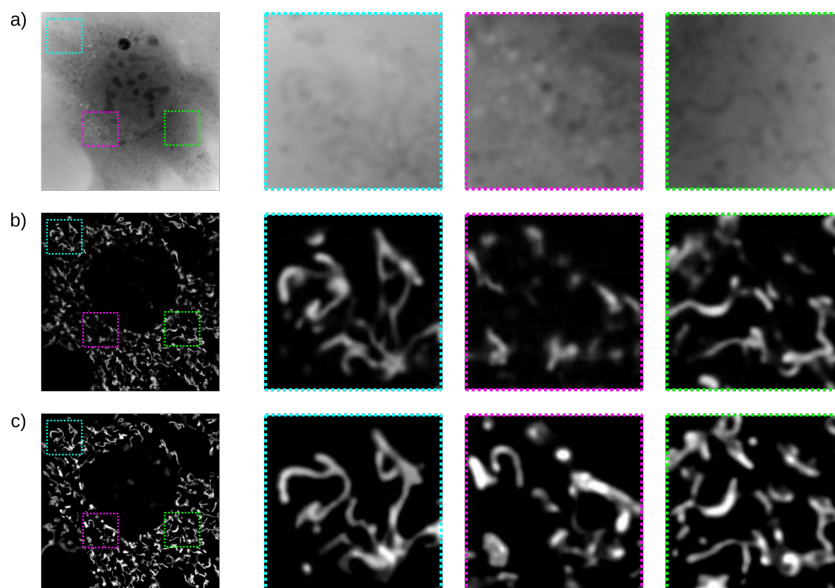


FIGURE 3.33 – Prédiction sur modèle entraîné à partir du signal de phase seul d’une cellule. Représentation et zooms du signal d’entrée a), de la prédiction du modèle b) et de la ground truth c).

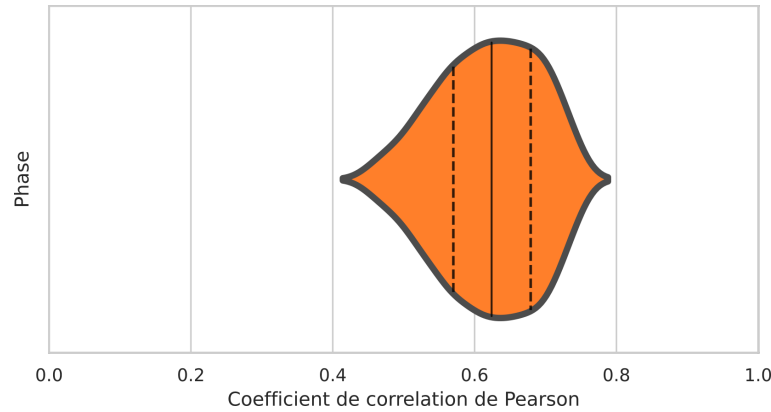


FIGURE 3.34 – Distribution des coefficients de corrélation entre les images prédites par le modèle entraîné avec la composante de phase seule. Représentation de la distribution excluant les 5% d’extrêmes. La moyenne et les quartiles sont représentés.

Prédiction double canaux

Étant donné que les deux composantes d’intensité et de phase donnent des résultats intéressants et différents l’un de l’autre, il semble normal d’essayer de les combiner. L’idée de la combinaison complexe a du sens d’un point de vue physique, mais nécessite des évolutions et une complexification du modèle et augmente ainsi le temps d’entraînement (Chapitre 3.3). Nous avons donc décidé d’essayer d’utiliser les deux composantes dans un modèle classique, en les utilisant comme deux canaux d’information distincts pour chaque image. Ainsi, l’ensemble des informations a priori inclus dans les deux composantes pourra être traité et utilisé pour le modèle prédictif. On peut remarquer sur la figure 3.35 que les prédictions sont meilleures que les composantes d’intensité ou de phase seules et assez proches des valeurs pour l’implémentation complexe.

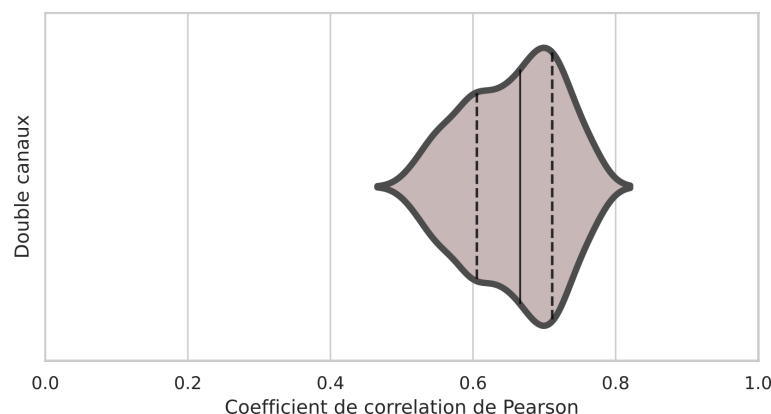


FIGURE 3.35 – Distribution des coefficients de corrélation entre les images prédites par le modèle entraîné avec les composantes d’intensité et de phase comme deux canaux du signal. Représentation de la distribution excluant les 5% d’extrêmes. La moyenne et les quartiles sont représentés.

Optimisation complexe

Nous avons vu que l'utilisation de la relation complexe provenant de la théorie du champ électromagnétique nous permet d'obtenir de bons résultats. Nous avons néanmoins voulu vérifier la nécessité d'utiliser cette relation complexe utilisant un logarithme népérien sur la composante d'intensité et un coefficient d'équilibrage entre les deux composantes.

Nous avons donc réalisé un entraînements utilisant les composantes de phase et d'intensité en relation complexe sans utiliser le lien théorique impliquant le logarithme népérien de l'intensité et l'équilibrage des deux composantes.

Les résultats de caractérisation de ce modèle sont visibles sur la figure 3.36. On peut voir une amélioration de ces résultats comparés aux composantes d'intensité ou de phase seules. Nous sommes cependant moins bons que pour le modèle entraîné avec la relation théorique entre les deux composantes d'intensité et de phase.

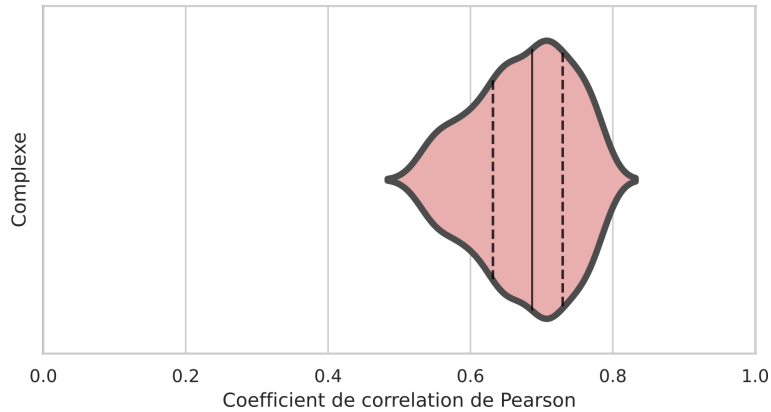


FIGURE 3.36 – Distribution des coefficients de corrélation entre les images prédites par le modèle entraîné avec les canaux d'intensité et de phase en relation complexe et les images de vraie fluorescence à atteindre. Représentation de la distribution excluant les 5% d'extrêmes. La moyenne et les quartiles sont représentés.

Nous avons ensuite modifié nos données d'entrée complexes pour utiliser la composante de phase avec le logarithme népérien de l'intensité, ceci afin d'avoir une relation entre les deux composantes plus proche de la relation théorique et d'introduire la non-linéarité entre les deux coefficients présente physiquement. L'utilisation de la fonction de logarithme népérien seule a permis une amélioration du modèle. Nous avons cependant décidé de vérifier que le coefficient d'équilibrage des canaux $\frac{\lambda}{4\pi}$ théorique (41 pour notre longueur d'onde de $520nm$) était optimal expérimentalement.

J'ai donc réalisé une série d'entraînements avec des coefficients d'équilibrages variables. La représentation des résultats de prédiction en fonction du facteur d'équilibrage est visible sur la figure 3.37. Nous voyons ainsi que la meilleure valeur en pratique est très proche de la valeur théoriquement optimale. On remarque également que lorsque le coefficient est très bas, et donc l'apport de la composante d'intensité négligeable, on retrouve les valeurs de corrélation des

modèles utilisant la composante de phase seule. De même, avec un coefficient très grand, la composante de phase devient négligeable et nous retrouvons les valeurs de corrélation du modèle entraîné uniquement sur la composante d'intensité. Nous avons donc décidé à partir de ce point de toujours équilibrer nos canaux avec un coefficient dépendant de la longueur d'onde et suivant l'équation 3.39.

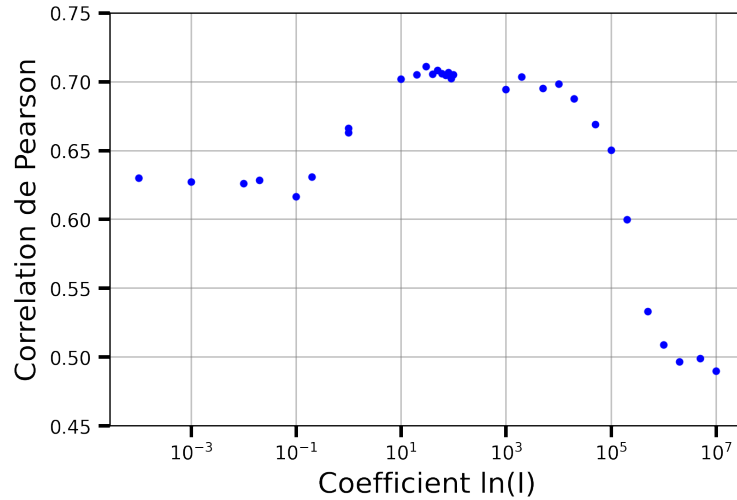


FIGURE 3.37 – Évolution du coefficient de corrélation de Pearson moyen entre les prédictions et les valeurs de fluorescence réelles dépendamment du coefficient d'équilibrage entre les composantes complexes.

La corrélation entre nos prédictions et la vraie fluorescence présentée dans la figure 3.28 est donc optimale, ce qui est en accord avec la théorie physique sur laquelle nous nous sommes appuyés pour le développement de ce modèle complexe. Nous avons donc décidé d'utiliser cette relation dans l'ensemble de nos entraînements.

3.4.3 Réticulum endoplasmique

Nous avons voulu ensuite voulu essayer d'entraîner notre nouveau modèle sur des éléments plus compliqués à analyser, à savoir le réticulum endoplasmique. En effet, le réticulum n'est pas visible à l'oeil nu, que ce soit sur les composantes d'intensité ou de phase de notre signal (Figure 3.38).

Nous avons entraîné un modèle sur un jeu de données de 207 cellules acquises en microscopie de phase et en fluorescence avec un marquage du réticulum endoplasmique. Pour un entraînement réalisé sur les données complexes avec le coefficient de corrélation de Pearson comme métrique d'apprentissage, nous obtenons des résultats qui se rapprochent de l'objectif pour la détection des zones de présence du réticulum et de leur intensité relative, mais qui n'arrivent pas du tout à retranscrire les détails fins du réticulum (Figure 3.39).

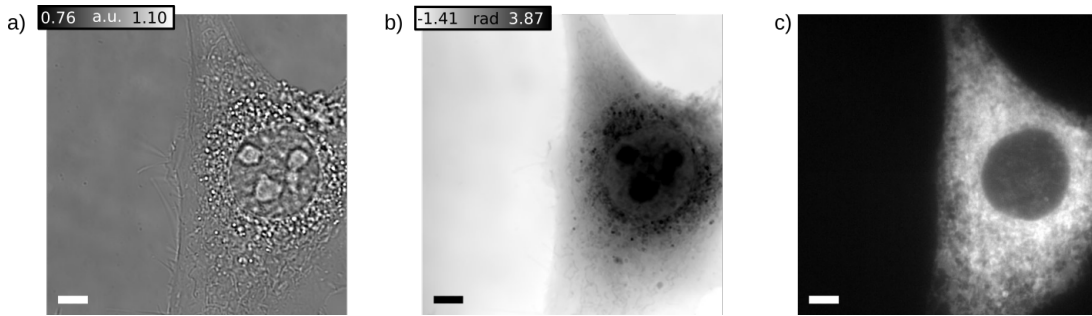


FIGURE 3.38 – Exemple d’acquisition pour une cellule du jeu de données complexe pour le réticulum endoplasmique. Acquisition conjointe du champ électromagnétique dont sont extraits les composantes d’intensité a) et de phase b), et de la fluorescence associée c). Échelle : $5\mu m$.

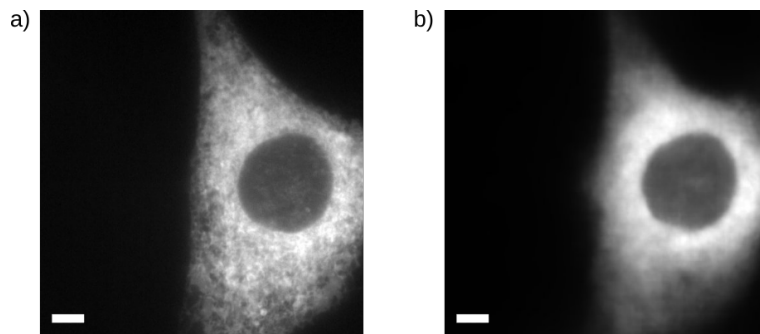


FIGURE 3.39 – Comparaison entre fluorescence réelle (a) et prédiction en sortie du modèle (b) pour le réticulum endoplasmique. Échelle : $5\mu m$.

Il est à noter qu’aucun autre entraînement sur le réticulum endoplasmique, que ce soit sur les composantes d’intensité ou de phase seules (Résultats non représentés) n’ont permis la convergence du modèle vers une prédiction approchant la fluorescence réelle. Il en est de même pour les modèles entraînés sur données complexes avec le MSE comme métrique d’apprentissage. Nous avons donc permis grâce à la combinaison de notre nouvelle métrique d’apprentissage et de l’utilisation de la donnée complexe du champ d’arriver à discerner le réticulum endoplasmique, ce qui ouvre de belles perspectives pour la suite avec des optimisations pour cet élément particulier.

3.5 Analyse critique de l'évolution

Le désir d'évolution du modèle de U-net classique vers notre modèle complexe reposait sur deux points distincts. D'un côté, un besoin de n'approprier ce modèle d'apprentissage profond afin d'en comprendre les rouages et le maîtriser pour pouvoir le faire évoluer au besoin. Simplement appliquer un modèle existant et fonctionnant plus ou moins correctement sans chercher à aller plus loin, ce qui est malheureusement souvent le cas dans les utilisations du U-net, n'était pas acceptable. De l'autre, l'envie d'avoir une approche physique de la problématique de segmentation d'éléments biologiques et donc de modifier l'architecture du modèle afin d'extraire le maximum d'informations de notre signal de microscopie quantitative de phase.

La principale évolution que nous avons mise en oeuvre a été l'évolution du modèle pour la prise en compte des données complètes du champ électromagnétique acquise grâce à notre caméra de phase et ainsi affiner les capacités de prédiction de segmentation à partir d'une acquisition microscopique en champ clair très peu invasive. L'utilisation conjointe des signaux d'intensité et de phase en relation complexe ont permis une amélioration visuelle dans la qualité de segmentation (Figure 3.40). On note en effet que l'utilisation conjointe des signaux permet non seulement d'arriver à prédire des mitochondries localisées dans le plan d'imagerie et ressortant en phase et peu en intensité (Flèches rouges sur la figure 3.40) mais également des mitochondries en profondeur visibles uniquement en intensité (Flèches jaunes). On obtient ainsi une combinaison des deux modèles initiaux résultant en une augmentation générale de la précision et une netteté des prédictions de mitochondries accrue.

Nous avons également caractérisé quantitativement les évolutions amenées par nos implémentations en réalisant des entraînements sur les différents types de modèles possibles avec les mêmes jeux de données et paramètres d'entraînement pour chacun. Les entraînements ont été réalisés sur des jeux de données de 206 images séparés entre jeu d'entraînement et jeu de tests avec comme métrique d'entraînement l'erreur quadratique moyenne, sur une durée de 60 époques avec un taux d'apprentissage décroissant au cours de l'entraînement. Une caractérisation a ensuite été réalisée sur l'ensemble des modèles entraînés ainsi que leurs répliques afin d'obtenir des valeurs moyennes de caractérisation. Les données de ces caractérisations sont représentées dans la table 3.1.

On remarque, comme prévu, que pour l'ensemble des métriques de caractérisation l'entraînement sur la composante de phase seule donne de meilleurs résultats qu'un modèle sur intensité seule, notamment pour le coefficient de Pearson. L'utilisation des deux canaux en entrée permet une amélioration comparée aux signaux d'intensité ou de phase seuls, ce qui confirme la complémentarité des informations portées par ces deux signaux. Le passage en complexe offre une légère amélioration. C'est particulièrement l'utilisation conjointe du logarithme népérien et de l'équilibrage des signaux pour obtenir un signal d'entrée ayant le plus de sens du point de vue physique (Chapitre 3.4.2), qui donne les meilleurs résultats, quelle que soit la métrique de caractérisation.

3.5. ANALYSE CRITIQUE DE L'ÉVOLUTION

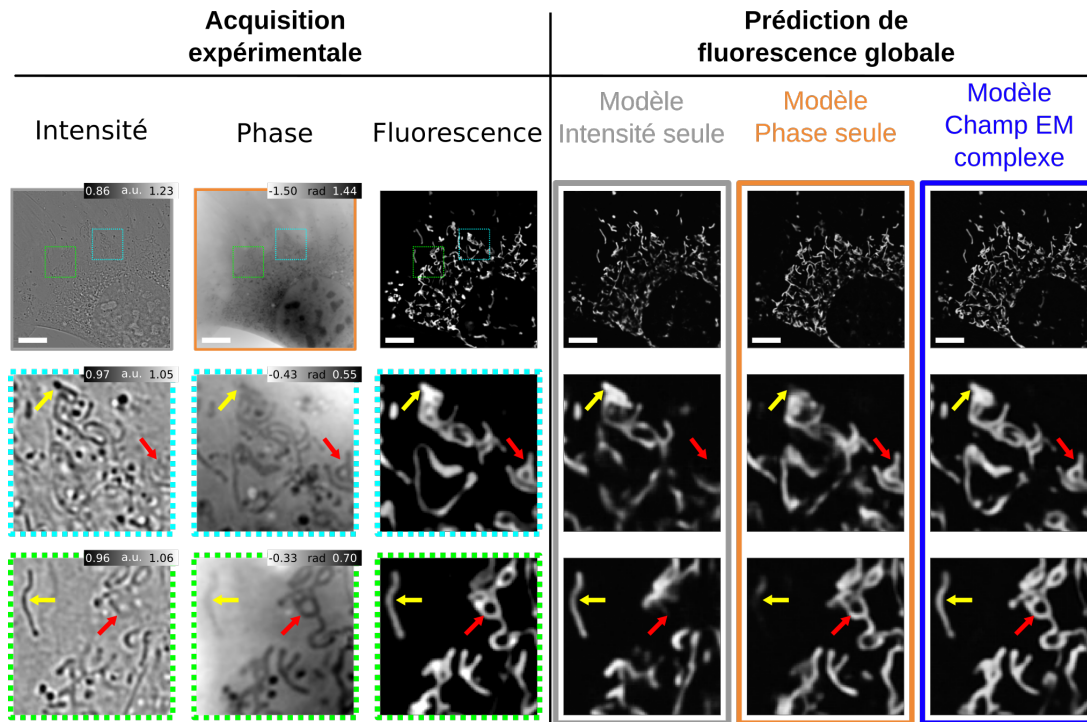


FIGURE 3.40 – Comparaison entre les modèles entraînés avec les composantes d'intensité ou de phase seules et le modèle utilisant la donnée de champ complexe. Les composantes d'intensité et de phase sont représentées ainsi que la fluorescence réelle. Des zooms mettent en lumière des zones d'intérêt pour la différenciation des différents modèles. Les flèches rouges et jaunes mettent en lumière des zones respectivement dans et hors du plan d'imagerie. Echelle : $10\mu m$.

TABLE 3.1 – Caractérisation des modèles entraînés avec différentes données d'entrée : le signal d'intensité seul, le signal de phase seul, les signaux d'intensité et de phase en relation complexe, les signaux d'intensité et de phase en tant que deux canaux d'image, le logarithme du signal d'intensité et le signal de phase en relation complexe, le signal complexe du champ de Rytov avec des signaux équilibrés.

	<i>Int.</i>	<i>Phase</i>	<i>Comp.</i>	<i>2 canaux</i>	<i>Comp. ln</i>	<i>Comp. equi.</i>
<i>MSE</i>	0.0153 ± 0.0048	0.0128 ± 0.0048	0.0111 ± 0.0041	0.0116 ± 0.0042	0.0109 ± 0.0040	0.0098 ± 0.0038
<i>Pearson</i>	0.504 ± 0.085	0.618 ± 0.085	0.674 ± 0.081	0.655 ± 0.080	0.682 ± 0.079	0.719 ± 0.077
<i>Dice</i>	0.047 ± 0.022	0.052 ± 0.023	0.056 ± 0.026	0.054 ± 0.024	0.057 ± 0.026	0.059 ± 0.027
<i>Jaccard</i>	0.351 ± 0.062	0.419 ± 0.065	0.456 ± 0.079	0.442 ± 0.066	0.465 ± 0.075	0.502 ± 0.074
<i>SSIM</i>	0.718 ± 0.109	0.747 ± 0.093	0.782 ± 0.085	0.773 ± 0.085	0.780 ± 0.082	0.795 ± 0.078

Nous avons également désormais accès à des possibilité de prédiction d'éléments invisibles à l'oeil nu, à savoir le réticulum endoplasmique, et ainsi combiner les prédictions de différents éléments pour faire ressortir des éléments de colocalisation (Figure 3.41).

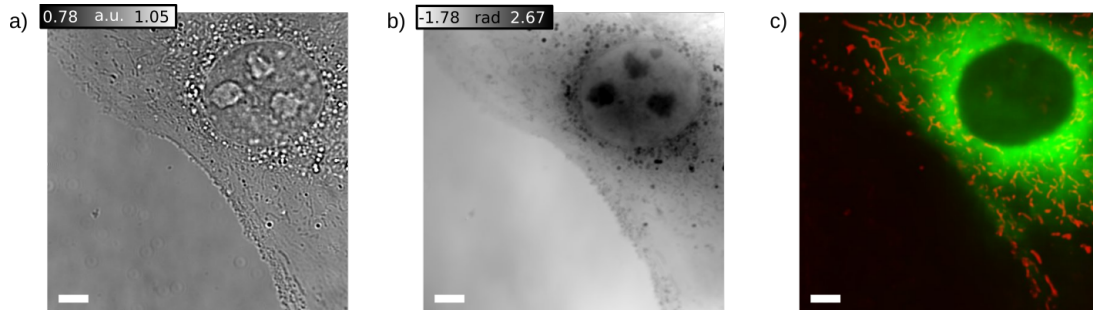


FIGURE 3.41 – Exemple de prédiction conjointe de plusieurs éléments cellulaires. Représentation des composantes d'intensité (a) et de phase (b) en parallèle de la fluorescence prédite (c) pour les mitochondries (rouge) et le réticulum endoplasmique (vert). Échelle : $5\mu m$.

Les résultats quantitatifs des améliorations apportées par nos différentes implémentations sont en accord avec les constats visuels que nous avons pu réaliser et valident complètement l'intuition physique de l'intérêt de l'utilisation de l'ensemble des informations du champ électromagnétique pour obtenir des prédictions optimales. Il reste néanmoins de nombreuses améliorations possibles, que ce soit dans l'optimisation des modèles ou du traitement en amont des données, notamment pour les éléments biologiques très peu détectables à l'oeil nu. De plus nous avons une amélioration dans nos résultats en deux dimensions grâce à l'utilisation d'une information de profondeur (le champ électromagnétique), il paraît donc naturel de faire évoluer notre modèle et nos acquisitions de données pour aller vers l'ajout de la profondeur comme troisième dimension d'imagerie et de considérer des études volumiques par essence plus adaptées à l'étude d'échantillons biologiques vivants.

Chapitre 4

Etude volumique

L'objet de cette thèse est le développement d'outils computationnels permettant de réaliser de l'imagerie spécifique et quantitative d'échantillons biologiques sans avoir recours à des marquages en fluorescence. Les échantillons biologiques s'inscrivant dans le cadre de cette étude sont des cellules de mammifères (Chapitre 2.1). Même si l'on se représente souvent les cellules, en particuliers les adhérentes, comme des objets très fins, elles sont par nature des éléments volumiques de plusieurs micromètres d'épaisseur (même pour les cellules adhérentes). L'imagerie (notamment de fluorescence) et le traitement en deux dimensions ne propose que l'accès à l'information utile sur $\sim 500\text{nm}$ (la profondeur de champ de notre microscope) est donc limité pour l'étude complète du fonctionnement de ces cellules et de leurs éléments internes.

Nous sommes donc passés à une architecture en trois dimensions pour traiter des images elles aussi en trois dimensions, qu'elles soient acquises expérimentalement ou régénérées numériquement. La mesure du champ électromagnétique que nous réalisons avec la microscopie de phase à décalage quadrilatéral (Chapitre 2.3.5) porte intrinsèquement des informations de volume qui peuvent être exploitées. Je détaillerai dans ce chapitre l'intérêt de ce type de mesures, les adaptations algorithmiques réalisées pour cet ajout de dimension ainsi que les résultats obtenus pour des prédictions de fluorescence en trois dimensions à partir de piles expérimentales ou reconstituées numériquement.

4.1 Informations 3D

La technique de microscopie quantitative de phase par interférométrie à décalage quadrilatéral que nous utilisons pour nos mesures de phase extrait les informations d'intensité et de différence de chemin optique à partir d'un interférogramme issu de l'auto-interférence du champ électromagnétique. Le champ électromagnétique mesuré est passé à travers tout l'échantillon et a donc été modifié par l'intégralité des éléments qu'il a rencontré, et non pas uniquement par ceux présents dans le plan d'imagerie.

On peut retrouver de l'information venant d'autres plans d'imagerie dans notre interférogramme. La partie la plus intéressante cependant réside après l'extraction des composantes d'intensité et de phase. En effet, la propagation en espace libre du champ va générer un transfert d'information depuis la phase vers l'intensité et inversement entre différents plans de mise au point. Ainsi, un objet d'indice (comme une cellule, exemple en figure 3.40) présentera une intensité quasi-nulle au focus et une phase très contrastée alors qu'un objet absorbant (une particule métallique par exemple comme dans la figure 4.1.a) aura une réponse opposée. Lorsqu'un défocus apparaît, il y a un transfert d'information entre phase et intensité. Ainsi sur des objets de phase comme des cellules, des éléments hors plan d'imagerie peuvent ressortir sur la composante d'intensité. Inversement, des éléments situés en dehors du plan d'imagerie peuvent ressortir sur la composante d'intensité et être très flous voire presque invisibles en phase (Figure 3.40).

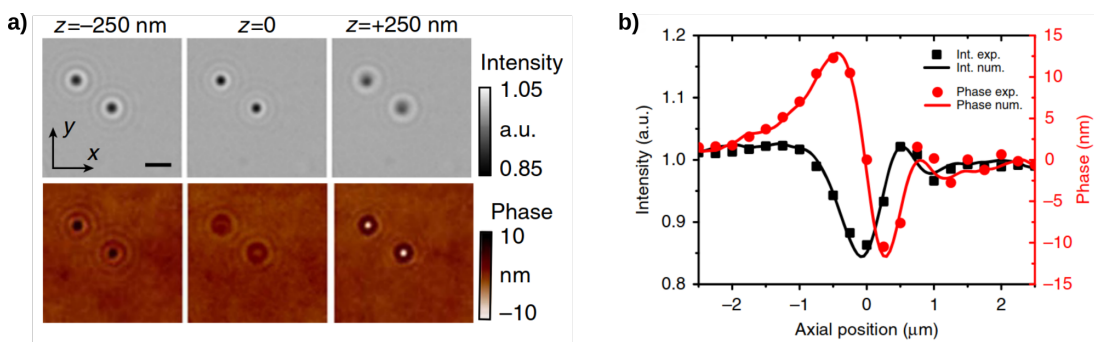


FIGURE 4.1 – (a) Images d'intensité et de phase de deux nanoparticules d'or (100nm), au point ($z = 0$) ou légèrement hors focus ($z = \pm 250$ nm). On notera l'inversion de contraste pour la phase et la faible variation du signal d'intensité. (b) Réponse en intensité (carrés noirs) et en phase (points rouges) d'une nanoparticule d'or de 100nm à un déplacement mécanique de l'échantillon. Les lignes sont le résultat de la propagation numérique calculée à partir du seul plan $z = 0$; ce ne sont pas des fits numériques mais des données expérimentales. Figure tirée de BON, BOURG, 2015.

Le champ électromagnétique porte des informations de profondeur (on parle d'imagerie holographique), mais ces informations sont limitées par le rapport signal à bruit des objets ayant une faible interaction lumière matière (très fins, quasi-transparents, ...) lorsqu'ils sont dé-focalisés. Également, l'ouverture numérique d'illumination (l'incohérence spatiale de la source pour être plus

précis) joue un rôle dans la profondeur de champ d'imagerie holographique : plus la source sera incohérente, plus faible sera la profondeur de champ (BON, AKNOUN, 2014), mais en contrepartie meilleure sera la résolution latérale et la capacité à effectuer une imagerie profonde. Il est donc utile de réaliser des piles d'acquisitions pour retrouver un signal de phase en trois dimensions le plus précis possible. Les informations de deux images successives sont ainsi complémentaires avec une notion de redondance qui pourra s'avérer utile lors de l'entraînement de nos modèles d'apprentissage profond pour faire ressortir des détails. Nous verrons que l'on peut faire de la propagation numérique pour, à partir d'une image 2D obtenir une pile 3D (Chapitre 4.4). Nous discuterons de l'espacement retenu entre les plans d'acquisition de phase et d'intensité pour l'ouverture numérique retenue (Chapitre 4.3.1).

4.2 U-net 3D

Après la validation du fonctionnement du modèle U-Net sur nos données complexes en deux dimensions, l'étape suivante était de passer à l'utilisation de l'ensemble des informations apportées par notre mesure du champ électromagnétique et donc de passer à un modèle en trois dimensions. L'utilisation de modèle en trois dimensions est primordiale pour l'étude correcte d'échantillons biologiques vivants. Je décris dans ce chapitre les adaptations du modèle d'apprentissage profond effectuées pour ce passage en profondeur ainsi que les compromis réalisés entre temps d'entraînement et justesse des prédictions de fluorescence.

4.2.1 Évolution du modèle

Le passage d'un modèle d'apprentissage profond fonctionnant sur des données en deux dimensions à un modèle fonctionnant sur des données en trois dimensions n'est pas très compliqué. La plupart des opérations et des fonctions nécessaires au bon fonctionnement du U-Net en deux dimensions ont des équivalents en trois dimensions. J'ai donc fait évoluer mes fonctions complexes de convolution, d'activation et de normalisation par lots afin de prendre en compte la dimension supplémentaire :

- Les fonctions de convolutions en deux dimensions avec des noyaux entraînaibles de $3 * 3$ ont été remplacés par des convolutions en trois dimensions par des noyaux entraînaibles de $3 * 3 * 3$. La relation complexe est la même qu'en deux dimensions (Paragraphe 3.3.2).
- La normalisation par lots complexe implique des calculs de covariance, d'espérance et de normalisation. Ces calculs sont transposables directement avec l'ajout de la troisième dimension.
- L'activation complexe est également directement transposable depuis de vecteurs à deux dimensions vers des vecteurs à trois dimensions.

La principale différence avec le modèle en deux dimensions réside dans les convolutions descendantes et transposées permettant de changer d'étage dans l'architecture U-Net. En effet, dans notre modèle en deux dimensions, une descente d'étage implique une réduction des dimensions des images étudiées. On divise par deux les dimensions x et y afin de changer d'échelle d'étude. Une transposition directe de ce modèle est possible pour des acquisitions en trois dimensions pour des images ayant globalement la même taille dans les trois dimensions. Si c'était le cas pour le modèle d'origine dont je me suis inspiré (OUNKOMOL, 2018) qui étudiait des images de microscopie électronique en trois dimensions, ce n'est clairement pas le cas pour nos images de phase et de fluorescence sur cellules vivantes (Chapitre 4.3.1). Nous avons 21 tranches en z . Nous utilisons donc des patchs de 16 pixels de profondeur. La division par deux de cette valeur à chaque descente d'étage réduirait de façon trop importante cette dimension et n'aurait plus de sens pour les convolutions des étages bas. Nous avons donc décidé de ne réduire cette dimension (et donc de l'augmenter dans la branche de décodage) qu'une fois sur deux.

4.2.2 Limitations

La principale limitation générée par le passage du modèle en trois dimensions est une limitation liée à nos moyens de calcul. L'ajout de cette troisième dimension augmente drastiquement le nombre de paramètres du modèle, le nombre d'opérations réalisées ainsi que la taille des éléments traités et par conséquent le temps d'entraînement. J'ai donc été obligé de faire des ajustements pour pouvoir continuer à effectuer les calculs sur notre carte graphique et pouvoir ainsi effectuer des tests réguliers et ajustements sans avoir recours à des moyens de calcul extérieurs.

La première évolution du modèle que j'ai réalisée, qui est une évolution présente dans de nombreux cas de passage de deux à trois dimensions a été de réduire la taille du modèle U-net à trois étages. Cette évolution a pour effet de grandement réduire le nombre de paramètres du modèle et donc la charge de calcul. Cette réduction a été validée en entraînant successivement deux modèles sur les mêmes jeux de données avec les mêmes hyperparamètres et pour seule modification le nombre d'étages. La différence de résultat de prédictions entre l'architecture à trois étages et celle à quatre étages est minime. Dans la balance entre justesse et complexité du modèle, nous avons décidé de sacrifier un peu de justesse pour une simplification du modèle et une réduction d'un temps de calcul déjà conséquent.

Avec la réduction de profondeur du modèle, il était logique de réduire la taille des patches d'entraînement. Comme on va réduire les dimensions x et y une fois de moins, il est logique de partir de patches plus réduits afin d'avoir des générations de carte de fonctions similaires à celles que nous avons précédemment. Nous sommes donc passé de patches de $128 * 128$ pixels en deux dimensions à des patches de $64 * 64 * 16$ en trois dimensions. Nous avons ainsi encore une dimension latérale de $8 * 8$ sur la couche inférieure du modèle. Cette réduction de taille de patch a également grandement aidé à la réduction de mémoire utilisée pour les calculs.

Une représentation du modèle final que nous avons utilisé est illustré sur la figure 4.2. A noter la réduction de la dimension en z qu'une fois sur deux et la taille réduite des patches dès le premier étage. Le reste du fonctionnement est classique pour un U-net en trois dimensions.

4.2.3 Conclusion

Les modèles sur lesquels je me suis appuyé pour ma thèse ont été développés pour pouvoir fonctionner en deux ou trois dimensions. De plus la majorité des fonctions des bibliothèques d'apprentissage profond ont un fonctionnement vectoriel qui permet l'augmentation facile de dimension et qui possèdent des fonctions en trois dimensions équivalentes à celles en une ou deux dimensions. L'adaptation pour le fonctionnement de notre modèle en trois dimensions n'a donc pas nécessité beaucoup de changements sur l'architecture.

Les modifications que j'ai du apporter se situent principalement sur la ges-

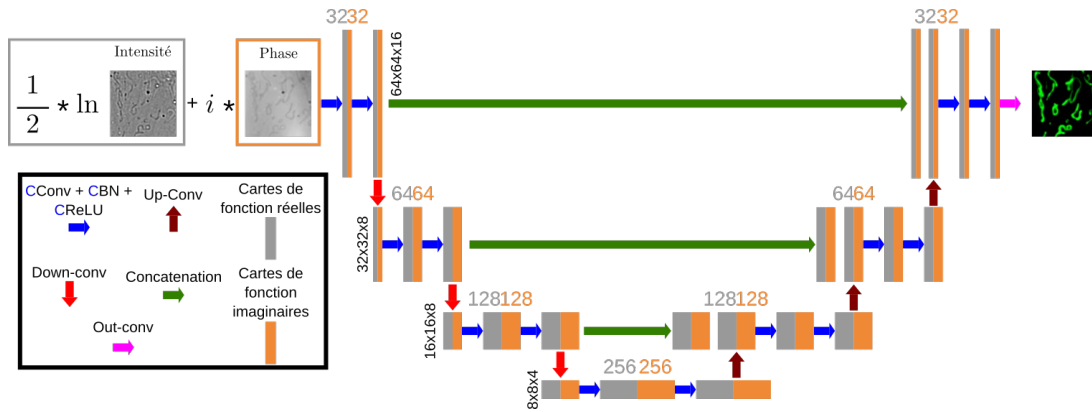


FIGURE 4.2 – Représentation du U-Net complexe en 3D. Pour des raisons de lisibilité, la représentation des images d’entrée et de sortie est en 2D. Le nombre de cartes de fonction réelles et imaginaires à chaque étage sont indiqués respectivement en gris et orange. Les convolutions descendantes et montantes ont été modifiées par rapport à un U-net normal.

tion des données à injecter dans le modèle pour prendre en compte des piles d’images regroupées en une image en trois dimension. De plus, quelques modifications pour adapter la taille du modèle à nos capacités de calcul ont été nécessaires. Cependant, nous avons retrouvé des résultats de bonne qualité, comme l’attestent les reconstructions visibles dans le chapitre 4.3.2, en réduisant la taille des patches d’entrée du modèle et en réduisant la profondeur du U-Net.

Le plus gros problème généré par ce passage en trois dimensions est le temps d’entraînement des modèles qui est passé de quelques heures pour un jeu de données complexes de 300 images en deux dimensions à plusieurs dizaines d’heures pour un jeu de données de même taille en trois dimensions. Il était donc nécessaire d’essayer d’optimiser le plus possible ce temps d’entraînement quitte à sacrifier un peu de justesse de prédiction.

Cette thèse étant fondatrice de la technologie et de ses applications, nous avons un besoin d’ajustements rapides en direct mais étions donc limités par la carte graphique utilisée (24 Go). Dans le futur, l’optimisation des temps de calcul et l’utilisation de ressources de calcul plus importantes permettra d’accélérer grandement ce processus et donc de revoir les compromis réalisés entre complexité du modèle, temps de calcul et justesse des prédictions.

4.3 Expériences 3D

Le passage de deux à trois dimensions n'implique pas beaucoup de modifications sur le modèle algorithmique que nous avons utilisé. Il nécessite néanmoins des modifications dans l'approche expérimentale d'acquisition des données et dans l'approche du traitement des piles d'images.

L'ajout de la profondeur génère certaines limitations qui n'étaient pas présentes en deux dimensions. La première concerne le temps d'acquisition. En effet, là où l'acquisition en deux dimensions ne nécessite qu'une seule image, le passage en trois dimensions nécessite des changements du plan d'imagerie et induit donc un décalage temporel entre les images constituant les piles. Nous aurions pu envisager une imagerie multiplans simultanés mais le budget en photon en fluorescence et la complexité expérimentale (multiples caméras ou réduction du champ de vue) nous ont fait choisir une approche par pile temporelle.

La quantité de calculs à effectuer pour l'entraînement de nos modèles prédictifs est grandement multipliée et nécessite une augmentation des moyens de calcul, une réduction de la complexité des modèles comme vu au chapitre 4.2 ou une autre approche dans l'utilisation des données.

Je parlerai dans ce chapitre des différentes modifications apportées à notre système d'acquisition expérimental, des stratégies adoptées pour l'utilisation de données en trois dimensions dans nos modèles d'apprentissage profond ainsi que des traitements sur les données en entrée des modèles permettant d'obtenir les meilleurs résultats possibles.

4.3.1 Acquisitions 3D

Afin de réaliser des acquisitions de microscopie en trois dimensions, on acquiert une pile d'images à différentes profondeurs dans l'échantillon qui, une fois regroupées, vont reconstituer une image en trois dimensions. Nos images en deux dimensions en fluorescence ont une profondeur de champ de $500nm$, nous avons donc décidé d'échantillonner nos acquisitions avec un écart entre deux images successives de $250nm$ afin de respecter le critère de Nyquist/Shannon. Les cellules fibroblastes que nous étudions ont une forme aplatie et donc une épaisseur réduite autour de 4 ou 5 microns. Nous avons donc décidé de réaliser des acquisitions de piles de 21 images afin de reconstituer un volume de $5\mu m$ de profondeur, avec la même taille d'images qu'en deux dimensions.

Afin d'avoir des mesures mettant en lumière l'état de l'échantillon à un instant t , l'optimal serait d'avoir une mesure instantanée de l'ensemble de la pile. Ce n'est pas le cas dans la réalité expérimentale comme expliqué en introduction de ce chapitre. La vitesse d'acquisition des ces piles d'images est limitée par plusieurs éléments. La séquence d'actions répétée pour cette acquisition est la suivante :

- éclairage en lumière blanche et acquisition de l'interférogramme,

- éclairage simultanément par diode d'excitation de fluorescence et acquisition du signal de fluorescence,
- déplacement dans l'échantillon pour acquérir l'image suivante.

Le temps d'acquisition de l'interférogramme n'est que de quelques dizaines de millisecondes et n'est donc pas l'élément limitant dans notre cas. Afin d'obtenir un rapport signal sur bruit correct au niveau de la fluorescence essentiel comme nous avons pu le voir expérimentalement pour un bon apprentissage, il est nécessaire d'avoir un temps d'exposition minimum, ce qui va limiter la vitesse d'acquisition. Une autre limitation se situe aussi dans le changement de plan d'imagerie entre deux images successives (Figure 4.3). Il existe plusieurs méthodes afin de réaliser ce changement de plan. Le déplacement mécanique de l'objectif nécessite un contrôle par moteurs piézo-électriques ou pas à pas et a un temps de réponse correct ($100ms$ à $300ms$) et une bonne précision ($5nm$ pour les piezo-électriques, $50nm$ en pas à pas). Nous avons choisi pour notre montage expérimental de privilégier l'utilisation d'une lentille déformable à focale variable pilotable par intensité électrique (Optotune AG, Suisse) qui présente un temps de réponse en déplacement fin de l'ordre de $20ms$. La prise en compte de ces éléments et leur optimisation nous a permis d'avoir une fréquence d'acquisition d'images de $3.5Hz$.

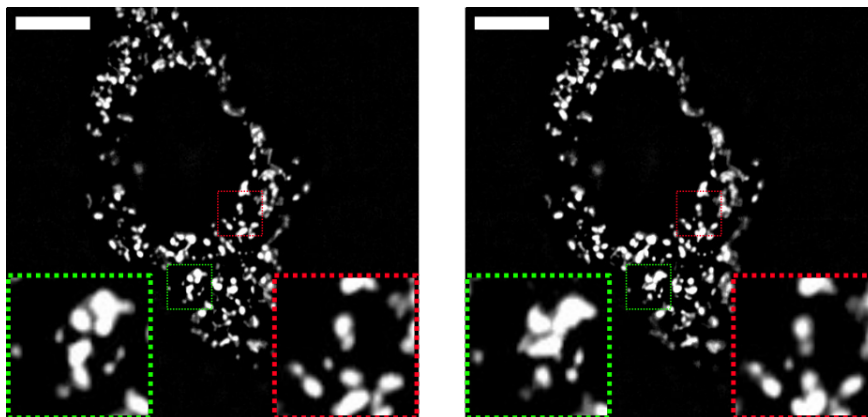


FIGURE 4.3 – Exemple du déplacement de mitochondries entre deux couches successives dans le cas d'une acquisition trop lente. Images de fluorescence mCardinal acquises à une seconde d'intervalle. Échelle : $10\mu m$.

Avec cette vitesse d'acquisition, une pile de $5\mu m$ constituée de 21 images prend un peu moins de 6 secondes à être acquise. Comme l'objet de nos recherches est l'étude des dynamiques intra-cellulaires, ce temps d'acquisition pose un problème pour les phénomènes rapides, mais est néanmoins satisfaisant pour des premières observations des mitochondries. Nous verrons par la suite que la propagation numérique nous permettant d'acquérir une seule image pour reconstruire la pile d'images nous permettra de réduire considérablement ce temps d'acquisition (du moins lors des expériences, l'entraînement nécessitant toujours une pile d'images de fluorescence).

4.3.2 Résultats

Jeu de données d'images aléatoires

Avant un passage effectif en algorithme 3D, nous avons testé l'entraînement 2D avec des données à différentes profondeurs pour voir si le modèle arrivait déjà à s'en sortir ou non.

Les premiers tests que nous avons réalisés pour le passage en trois dimensions ont consisté à entraîner des modèles d'apprentissage profond en deux dimensions tels que décrits dans le chapitre 3.3 sur des images prises à différentes profondeurs dans des cellules afin d'avoir les différents cas de figure d'images de phase avec des éléments intra-cellulaires, les mitochondries en l'occurrence, plus ou moins bien imagées ou partiellement visibles en profondeur. Ces tests n'ont pas été concluants, trop peu d'images contenaient du signal utile.

Jeu de données augmenté

Nous avons décidé de construire des jeux de données d'entraînement constitués de cinq images d'une pile séparées de $750nm$ les unes des autres prises aléatoirement dans la pile. Ainsi, nous pouvions être sûr d'avoir des images contenant des mitochondries ainsi que des images des parties des cellules n'en contenant pas. La figure 4.4 montre l'exemple d'images prises dans une pile d'une cellule fibroblaste dont les mitochondries ont été marquées. On notera que la première couche est située sous la cellule et on distingue seulement les mitochondries floues. C'est le genre de couche très utile pour l'entraînement en trois dimensions car elle possède des informations sur les mitochondries dans un plan différent de celui d'imagerie. En revanche, les deux dernières couches qui sont sur le haut de la cellule et en dehors de la cellule, n'apportent que peu d'informations, si ce n'est une correspondance nulle entre les images de phase que l'on image à ces profondeurs et du signal cible.

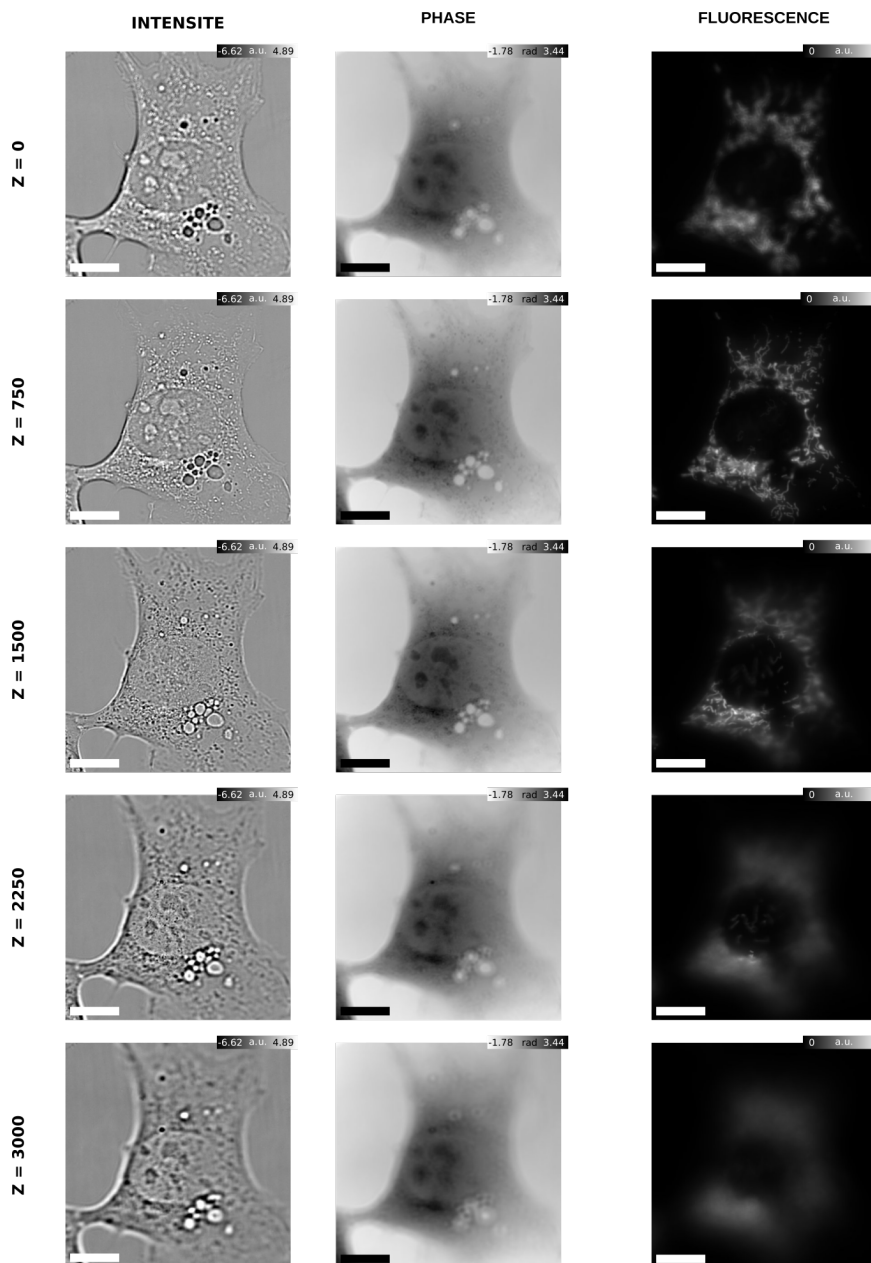


FIGURE 4.4 – Exemple d'éléments du jeu de données d'entraînement d'un modèle en deux dimensions devant fonctionner à différentes profondeurs dans l'échantillon afin de reconstruire une prédiction en trois dimensions. Une image de la cellule est prise tous les 750nm. On remarquera la présence de mitochondries correctement imagées uniquement dans les images 750 et 1500. Échelle : $10\mu m$.

Les résultats obtenus avec un entraînement sur ce jeu de données sont encourageants, avec une reconstruction des mitochondries très bonne dans les zones périphériques de la cellule dans la partie plate des cellules (Figure 4.5.a). Cependant, dès lors que l'on est dans une zone un peu chargée (Figure 4.5.b) ou proche du noyau (Figure 4.5.a) on n'obtient qu'un flou et très peu de qualité de reconstruction (Zooms rouges). Enfin pour les zones hautes de la cellule, on n'arrive pas du tout à reconstruire des éléments pourtant correctement imagés (Figure 4.5.c), principalement du au fait d'avoir beaucoup de signal provenant du volume sous le plan visé (Zooms rouges).

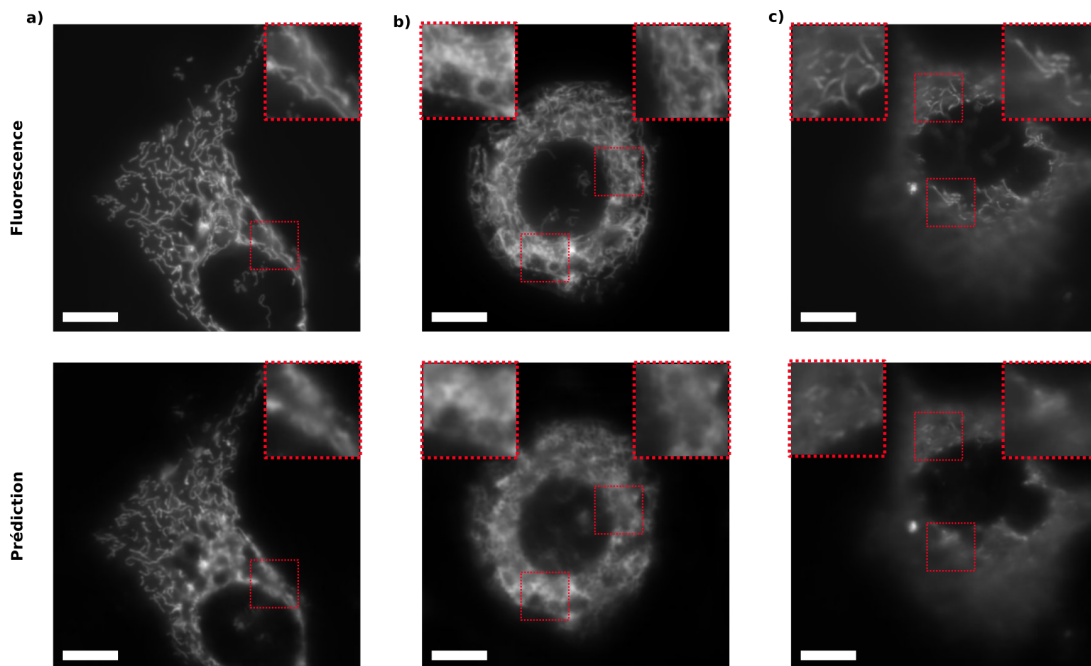


FIGURE 4.5 – Prédications à partir d'un modèle entraîné avec le jeu de données illustré dans la figure 4.4. (a) Exemple de cellule étalée où les mitochondries sont correctement prédites sur les parties peu peuplées en périphérie et peu visibles dans les zones chargées. (b) Exemple de cellule pour laquelle la reconstruction marche très mal à cause de la quantité de signal en profondeur. (c) Cellule imagée dans sa zone supérieure, où peu de mitochondries sont présentes avec une prédiction très mauvaise. L'intensité des images a été normalisée. Les zones problématiques sont indiquées à l'aide de flèches rouges. Échelle : $10\mu m$.

En entraînant un modèle sur l'ensemble des images de l'ensemble des piles de notre jeu de données, nous n'avons pas retrouvé d'amélioration notable. Nous avons anticipé ce résultat, étant donné que la prise en compte de l'ensemble des couches revient à augmenter la taille du jeu de données sans le diversifier, et revient donc quasiment au même qu'une augmentation numérique de la taille de ce jeu. Les prédictions obtenues avec l'entraînement d'un modèle en deux dimensions prenant en compte ces piles complètes d'images n'a produit des résultats que faiblement meilleurs qu'avec l'application de modèles en deux dimensions entraînés précédemment au plan d'imagerie optimal. Les quelques améliorations se situent dans les couches peu profondes où peu de mitochondries sont présentes, et ce seulement si la zone n'est pas trop épaisse et chargée

en éléments dans la profondeur. Il n'y a pas non plus de prise en compte du lien plan-à-plan que l'on aurait avec une convolution 3D.

Modèle en trois dimensions

Devant les limitations liées à l'utilisation de modèles entraînés en deux dimensions, nous sommes passés à un modèle d'apprentissage fonctionnant sur des données en trois dimensions. Nous avons donc fait évoluer l'architecture (Chapitre 4.2) pour pouvoir prendre en compte et traiter l'ensemble de la pile d'images et ainsi utiliser les relations entre couches successives et la continuité du signal pour affiner les prédictions.

Les résultats obtenus sur les mêmes piles d'images que pour les études en deux dimensions ont montré des résultats sensiblement meilleurs qu'avec les entraînements de modèles en deux dimensions. Des exemples de prédiction de fluorescence de mitochondries par un modèle entraîné en trois dimensions sont montrés sur les figures 4.6 et 4.7. Dans ces deux figures, des zones correctement reconstruites à différents niveaux de profondeur sont mise en valeur (zones et zooms verts). Ces zones correspondent à des parties en périphérie des cellules ou à des endroits où peu de signal de profondeur est présent, et fournissent des résultats similaires à ceux que nous pouvions obtenir avec les modèles en deux dimensions.

Certaines zones restent problématiques (exemples sur les zooms rouges) dans des endroits des cellules chargés en mitochondries et autres éléments biologiques visible en phase. Ces zones sont souvent proches du noyau et correspondent aux parties des cellules plus épaisses d'une part et où nombre d'autres organelles sont présentes (vésicules, appareil de Golgi, ...). On notera par exemple la zone rouge de la figure 4.7 qui présente de nombreuses mitochondries sur les images de fluorescence, et ce quelle que soit la profondeur, qui ne sont pas reconstruites lors de la prédiction par notre modèle entraîné. On distingue cependant dans certaines couches un début de signal utile mais qui est malheureusement peu distinguable du bruit et donc non exploitable. En revanche, en ce qui concerne la zone mise en valeur en rouge dans la figure 4.6, les couches centrales où les mitochondries sont correctement imagées en fluorescence présentent un début de prédiction encourageant. Le signal est bruité avec un halo dû au signal en profondeur, mais des mitochondries sont discernables et commencent à être reconstruites.

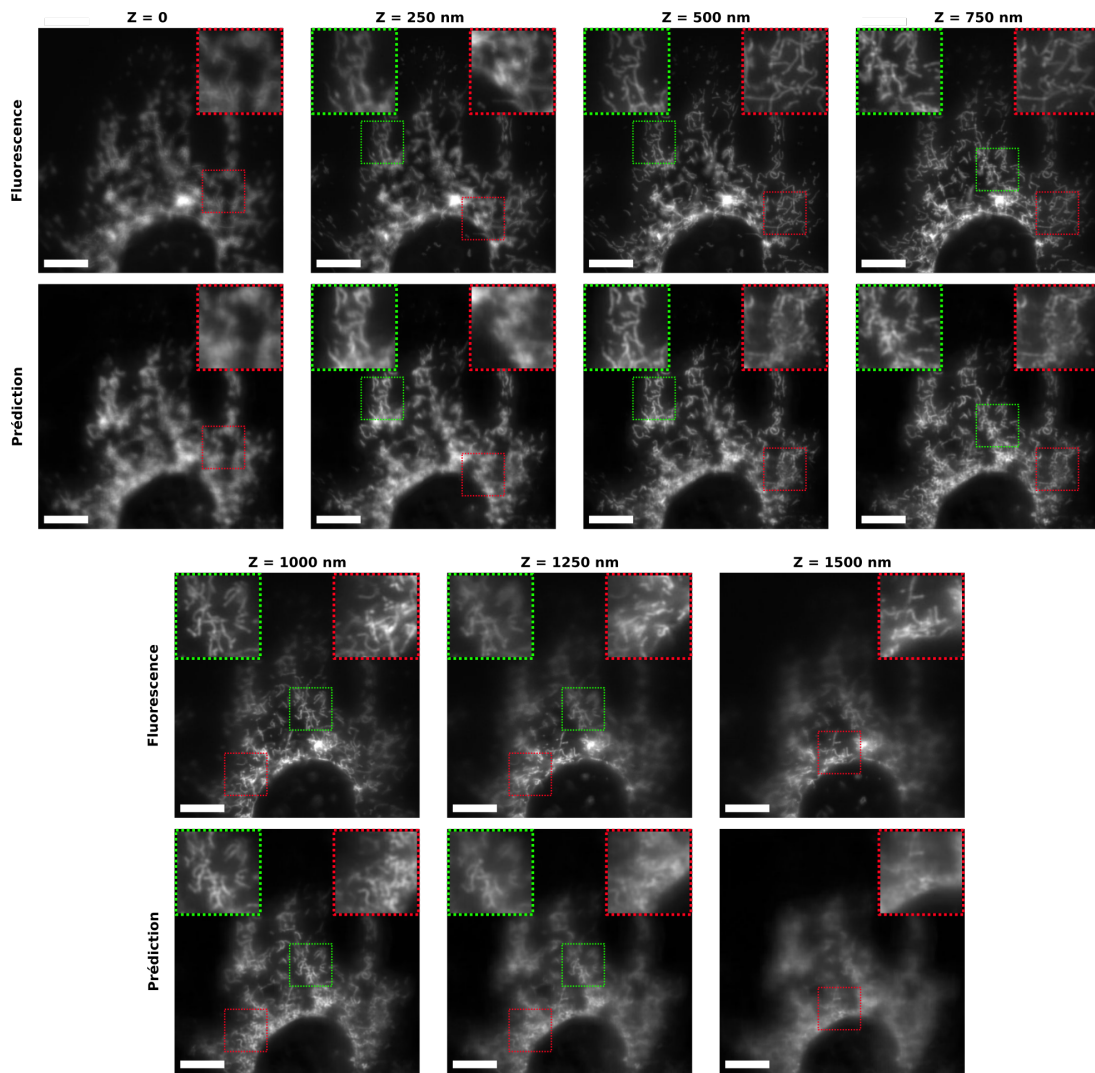


FIGURE 4.6 – Prédiction à partir d'un modèle en trois dimensions entraîné avec le jeu de données de piles d'images précédent. Prédiction sur une cellule du jeu de données de test. Seule la partie de la pile d'images comportant des mitochondries est représentée. A $Z=0$, nous sommes sous la cellule et rentrons dedans à partir de $Z=250$. Les zones vertes et les zooms associés correspondent à des zones correctement reconstruites. Les zones rouges et les zooms associés correspondent à des zones mal prédites. L'intensité des images a été normalisée. Échelle : $10\mu m$.

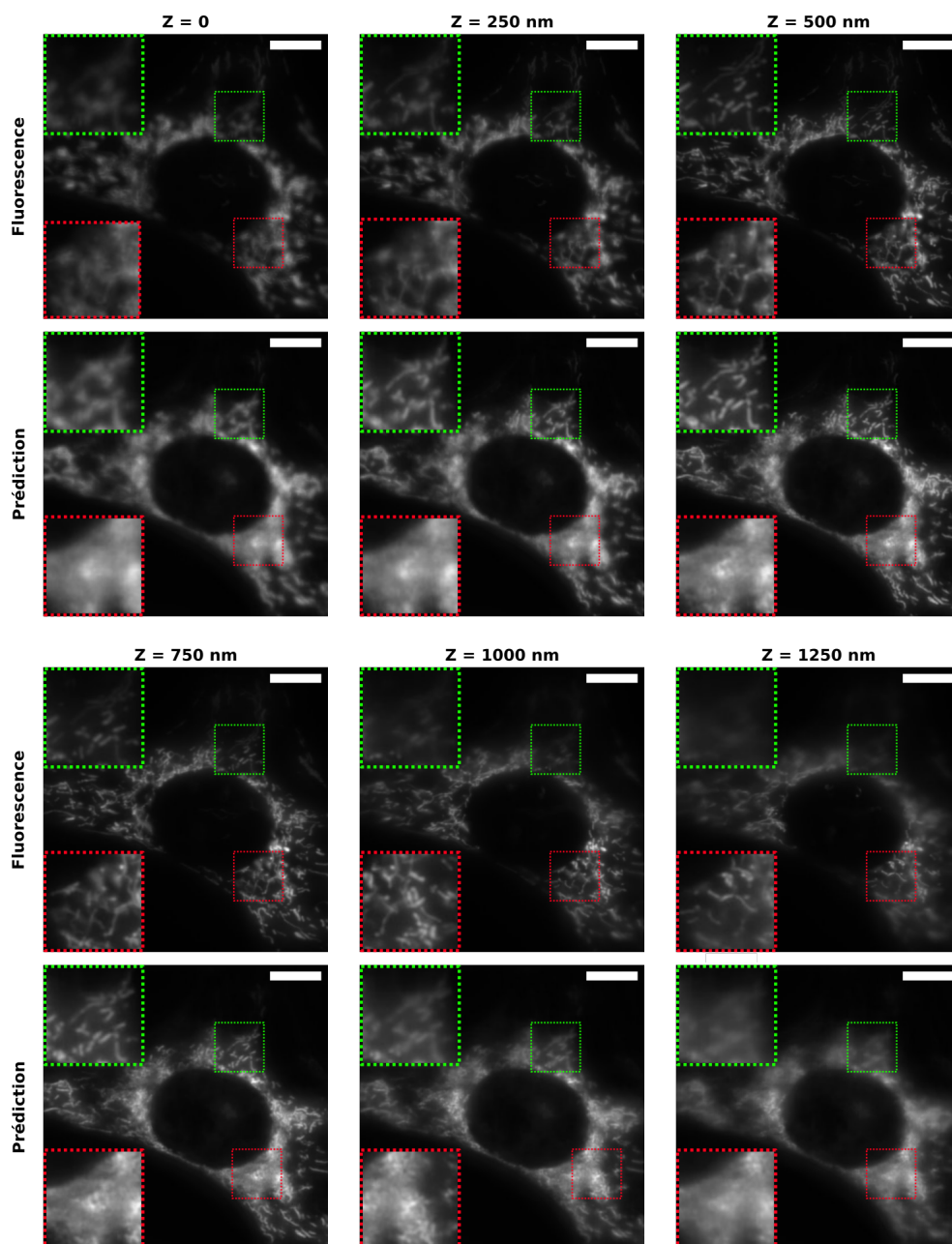


FIGURE 4.7 – Prédiction à partir d'un modèle en trois dimensions entraîné avec le jeu de données de piles d'images précédent. Prédiction sur une cellule du jeu de données de test. Seule la partie de la pile d'images comportant des mitochondries est représentée. Les zones vertes et les zooms associés correspondent à des zones correctement reconstruites. Les zones rouges et les zooms associés correspondent à des zones mal prédites. L'intensité des images a été normalisée. Échelle : $10\mu m$.

Le passage de notre modèle vers une architecture prenant en compte des données en trois dimensions a permis une amélioration de la qualité de prédiction de la fluorescence des mitochondries dans les plans où les mitochondries sont correctement imagées et surtout dans les images des piles éloignées des plans contenant le plus de mitochondries (parties hautes des cellules). Il reste cependant le problème des zones chargées en information, généralement proches du noyau, et correspondant le plus souvent aux parties épaisses des cellules. Dans ces zones, on perçoit dans certaines images un début de signal utile mais qui est souvent entouré de beaucoup de bruit. Ce bruit est également présent dans les images de fluorescence réelle utilisées pour l'entraînement. En effet, sur les zones chargées et comportant un grand nombre d'éléments fluorescents en profondeur, le signal de fluorescence provenant des profondeurs hors du champ est collecté en partie et produit ce bruit de fond. Il est donc nécessaire de s'en défaire afin d'améliorer nos résultats de prédiction. Afin d'aider la convergence de l'algorithme, nous avons cherché une méthode pour nous affranchir de cette limitation comme nous le verrons au chapitre 4.3.3.

Nous avons également réalisé le même type d'entraînement sur des données provenant de cellules dont le réticulum endoplasmique était marqué. Un exemple de résultat est visible sur la figure 4.8. Le modèle peine à reconstruire le réticulum endoplasmique de la même manière qu'en deux dimensions. On peut voir qu'il arrive à prédire les zones globales où le signal est attendu mais échoue à reconstituer les structures fines du réticulum. On peut même voir à certains endroits des prédictions se dessiner des formes de mitochondries. Ceci peut s'expliquer par le manque d'information concrète dans le signal complexe d'intensité et de phase auxquelles raccorder les structures de réticulum. On touche peut-être ici une des limites de nos capacités d'entraînement et de prédiction pour le réticulum endoplasmique. Ceci sera néanmoins à vérifier avec les améliorations des modèles.

En revanche, une des applications possibles avec nos piles d'images marquées en fluorescence sur le réticulum est d'utiliser un des modèles entraîné pour les mitochondries sur le signal afin d'apporter une prédiction de l'emplacement des mitochondries dans les cellules et de mettre ces prédictions en complément du signal de fluorescence généré par le réticulum endoplasmique. Un exemple de ce genre d'application est représenté dans la figure 4.9 où nous avons utilisé un modèle entraîné à prédire la fluorescence déconvoluée (Chapitre 4.3.3) provenant de mitochondries. La prédiction par ce modèle des mitochondries de la cellule exposée dans la figure 4.8 donne de très bons résultats et pourra permettre une bonne colocalisation entre les mitochondries *via* cette prédiction et le réticulum endoplasmique *via* l'acquisition de fluorescence ou *via* prédiction si les basses fréquences de l'image sont suffisantes pour l'application biologique.

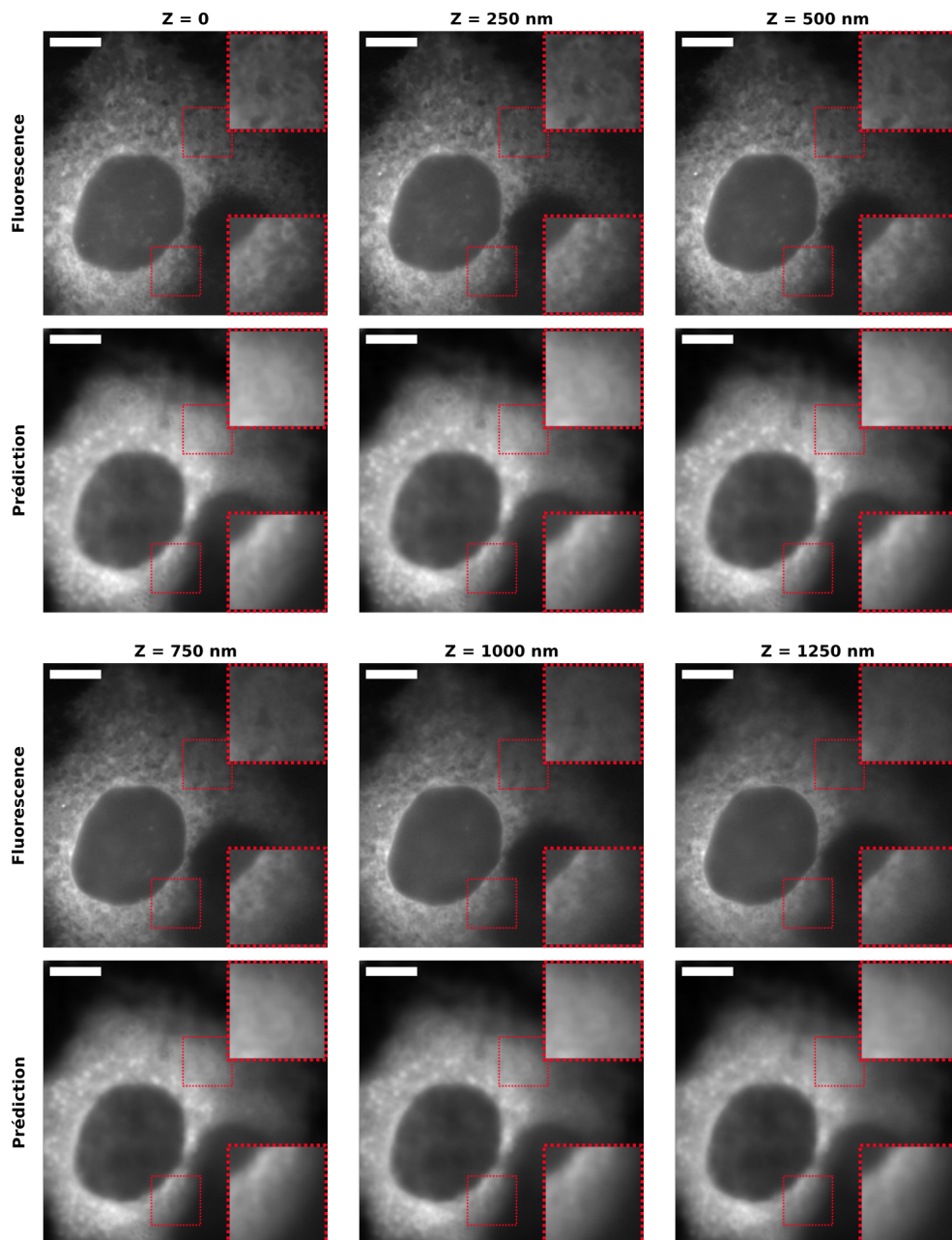


FIGURE 4.8 – Prédiction à partir d'un modèle en trois dimensions entraîné pour prédire de la fluorescence venant du réticulum endoplasmique. Prédiction sur une cellule du jeu de données de test. Les zones rouges et les zooms associés correspondent à des zones mal prédites. L'intensité des images a été normalisée. Échelle : $10\mu m$.

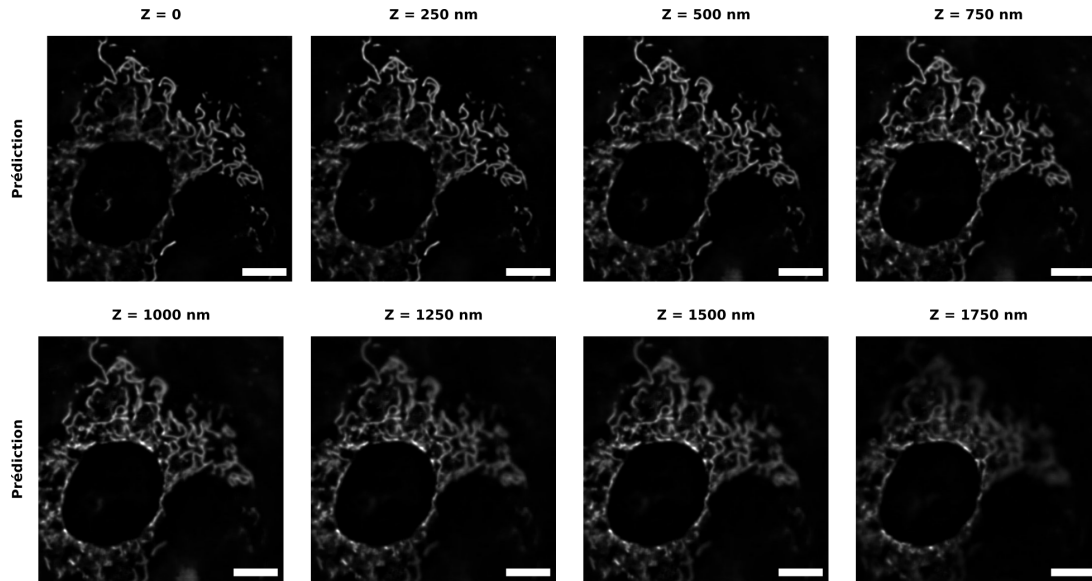


FIGURE 4.9 – Prédiction à partir d'un modèle en trois dimensions entraîné pour prédire de la fluorescence déconvoluée venant des mitochondries. La cellule représentée ici est la même que celle utilisée dans la figure 4.8. L'intensité des images a été normalisée. Échelle : $10\mu m$.

On peut désormais combiner les deux canaux prédits afin d'avoir une image composite comprenant la prédiction de fluorescence des mitochondries ainsi que celle du réticulum endoplasmique et ainsi observer des phénomènes de colocalisation ou des interactions particulières entre ces deux éléments (Figure 4.10). On remarque que les mitochondries sont dans l'ensemble à des endroits où du réticulum est présent.

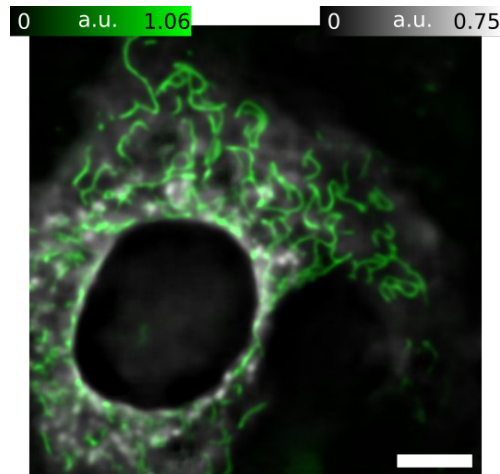


FIGURE 4.10 – Représentation double canaux des prédictions réalisées sur la cellule mise en lumière dans les figures 4.8 et 4.9. La prédiction de mitochondries est représentée en vert et celle du réticulum endoplasmique est représentée en gris pour des questions de lisibilité. On peut voir certaines zones contenant des informations pour les deux organelles. Échelle : $10\mu m$.

4.3.3 Déconvolution des piles 3D

Le principal intérêt des acquisitions de microscopie quantitative de phase réside dans le signal sur la profondeur contenu dans nos acquisitions (Chapitre 4.1). C'est une des raisons principales qui nous poussent à utiliser de la microscopie en champ clair et non un système confocal. Cependant, dès lors que nous réalisons des acquisitions en trois dimensions, les différentes sources de fluorescence au sein de notre échantillon vont être présentes dans une de nos images. On peut donc réaliser une déconvolution sur notre signal de fluorescence afin de s'affranchir du bruit de fond présent dans nos essais précédents et qui, comme nous l'avons vu, n'aide pas le modèle de prédiction.

Fonction d'étalement du point

La fonction d'étalement du point est la réponse d'un système d'imagerie à une source ponctuelle. Dans le cas d'un système optique, ici notre microscope, elle va représenter l'étalement du point lié au passage dans ce système. Pour un système optique sans aberration, c'est une tâche d'Airy qui est formée. C'est l'équivalent en deux dimensions de la réponse impulsionnelle classiquement utilisée en traitement du signal.

Déconvolution

On peut, en connaissant la fonction d'étalement du point, utiliser des opérations de déconvolution afin d'inverser le processus d'étalement et ainsi améliorer la résolution.

Nous avons dans notre cas choisi d'utiliser l'algorithme de Richardson-Lucy qui est un algorithme itératif convergeant vers la solution de déconvolution la plus probable (SHEPP, 1982). Nous ne décrivons pas ici le fonctionnement précis de cet algorithme.

Mesure de la fonction d'étalement du point

Il existe plusieurs façons de mesurer expérimentalement la fonction d'étalement du point d'un système optique. On peut par exemple utiliser des éléments fluorescents, comme des billes fluorescentes de diamètre connu inférieur à la limite de résolution (et agissant donc comme une source ponctuelle), et mesurer la taille du point de fluorescence obtenu à travers le système.

Nous avons utilisé des billes de 100nm (TetraSpeck) déposées sur lamelles par spin-coating. On fait l'hypothèse que les aberrations de cette acquisition seront les mêmes que dans notre échantillon. Afin d'avoir une mesure plus précise, nous avons réalisé une moyenne de dix acquisitions d'éléments de fluorescence ponctuels fittés en trois dimensions par une fonction gaussienne (approximation de la tâche d'Airy) pour retrouver le centroïde exact pour chacun et ainsi les recombinaison correctement.

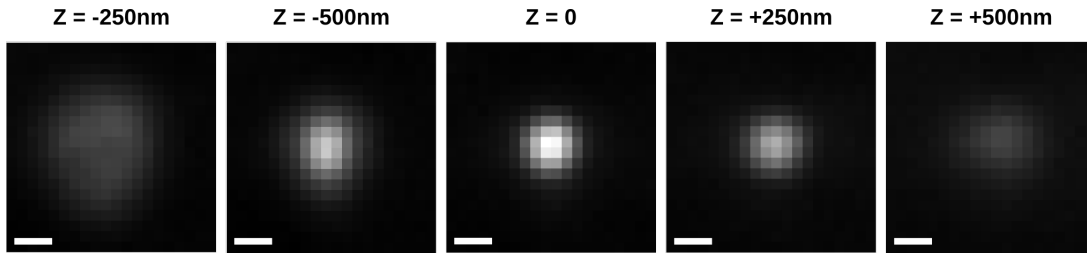


FIGURE 4.11 – Exemple d’une acquisition expérimentale de la fonction d’étalement du point à partir d’une des images de fluorescence du jeu de données d’entraînement. Cette mesure est ensuite fittée par une gaussienne et moyennée avec d’autres mesures. L’intensité des images a été normalisée. Échelle : $400nm$.

Traitement des données expérimentales

Une fois la fonction d’étalement du point mesurée expérimentalement, nous avons pu utiliser l’algorithme de Richardson-Lucy sur l’ensemble de nos piles d’images de fluorescence et ainsi retrouver un signal de fluorescence déconvolué.

L’effet de cette déconvolution est illustré sur la figure 4.12 montrant des images tirées de pile d’images de fluorescence pour un marquage de la membrane externe des mitochondries par mCherry.

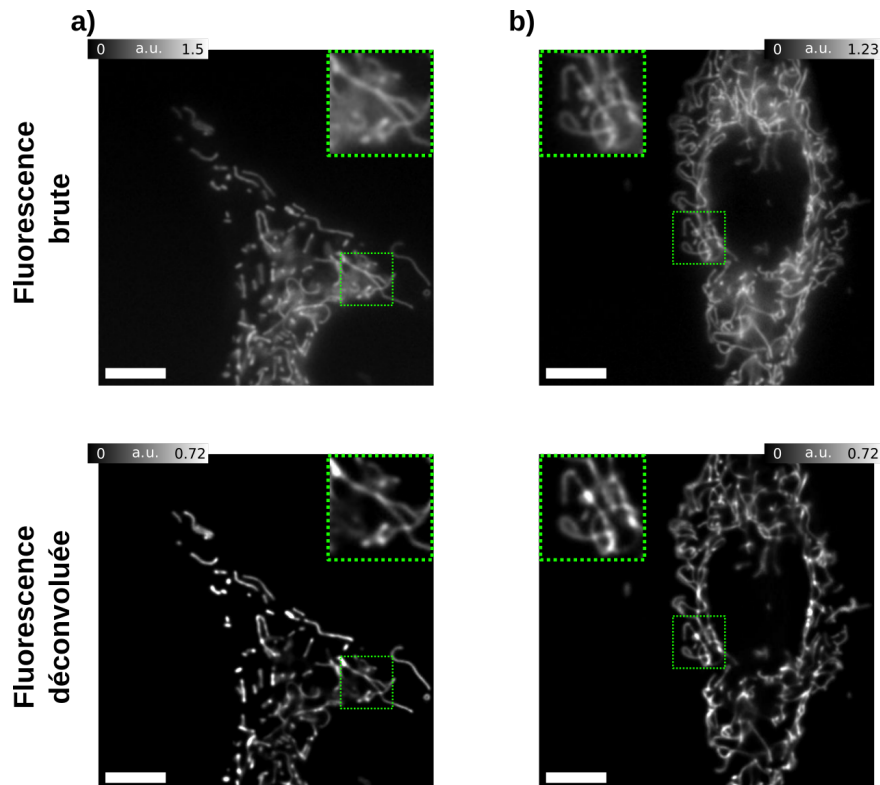


FIGURE 4.12 – Comparaison entre images de fluorescence brutes et déconvoluées. (a) Zone inférieure d’une cellule plate. A noter la disparition du signal de fond sur les zones proches du noyau et la parfaite définition des éléments dans le plan d’imagerie. (b) Cellule étroite et chargée en informations en profondeur. A noter en particulier la disparition du bruit et la diminution d’intensité des mitochondries dans les plans inférieurs ou supérieurs proches. Échelle : $10\mu m$.

4.3. EXPÉRIENCES 3D

Une fois la déconvolution appliquée sur l'ensemble des images constituant la pile on obtient des images de fluorescence nettoyées de la fluorescence hors plan bien plus lisibles avec une séparation nette des différents éléments fluorescents et une possibilité de suivi de la forme de mitochondries individuelles en profondeur. Le type de pile que nous obtenons grâce à cette déconvolution est illustré dans la figure 4.13 pour un marquage de la membrane externe des mitochondries par mCherry. On notera l'apparition et la disparition claire d'éléments distincts en fonction du plan d'imagerie et la baisse de signal à mesure que l'on monte dans les couches hautes de la cellule ne contenant plus de mitochondries.

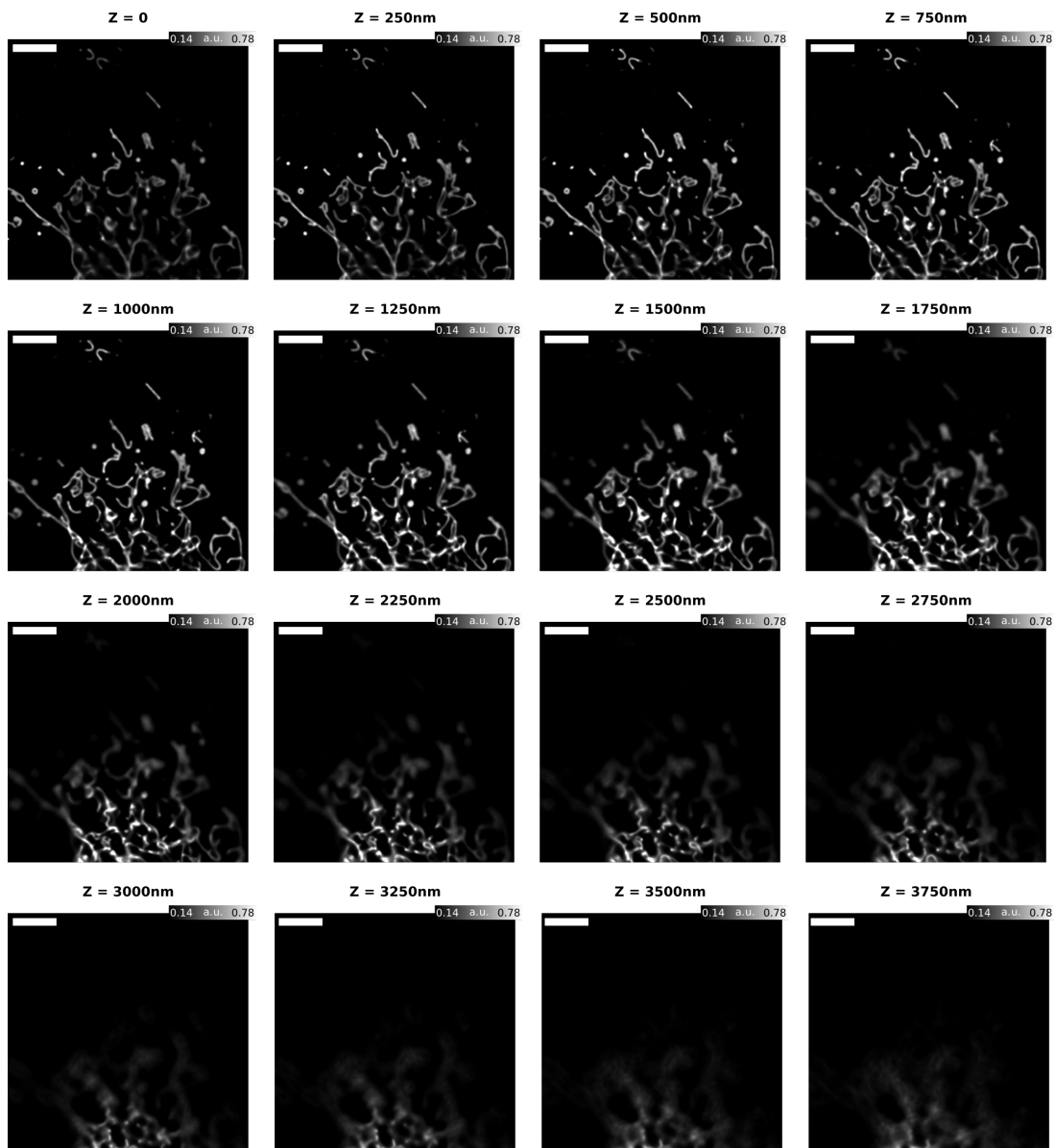


FIGURE 4.13 – Pile d'images de fluorescence déconvoluées d'une cellule marquée sur la membrane externe des mitochondries. A noter particulièrement l'apparition et la disparition des mitochondries en fonction du plan d'imagerie, et le nombre décroissant de mitochondries visible en montant dans les couches hautes, caractéristique des fibroblastes aplatis contenant la majorité des éléments proches de la lamelle. Échelle : $10\mu m$.

4.3.4 Prédiction sur données déconvoluées

Nous avons déconvolué l'ensemble des piles de fluorescence de notre jeu de données de cellules et avons réalisé un nouvel entraînement en trois dimensions sur ce jeu de données avec les données complexes en trois dimensions comme signal. Les résultats de prédictions donnent des piles de fluorescence prédites très proches de la fluorescence déconvoluée réelle comme illustré dans la figure 4.14 (même cellule que dans la figure 4.13 où l'on voit les données réelles déconvoluées). On y voit une correspondance très bonne avec l'objectif à atteindre quelle que soit la couche et les mitochondries observées.

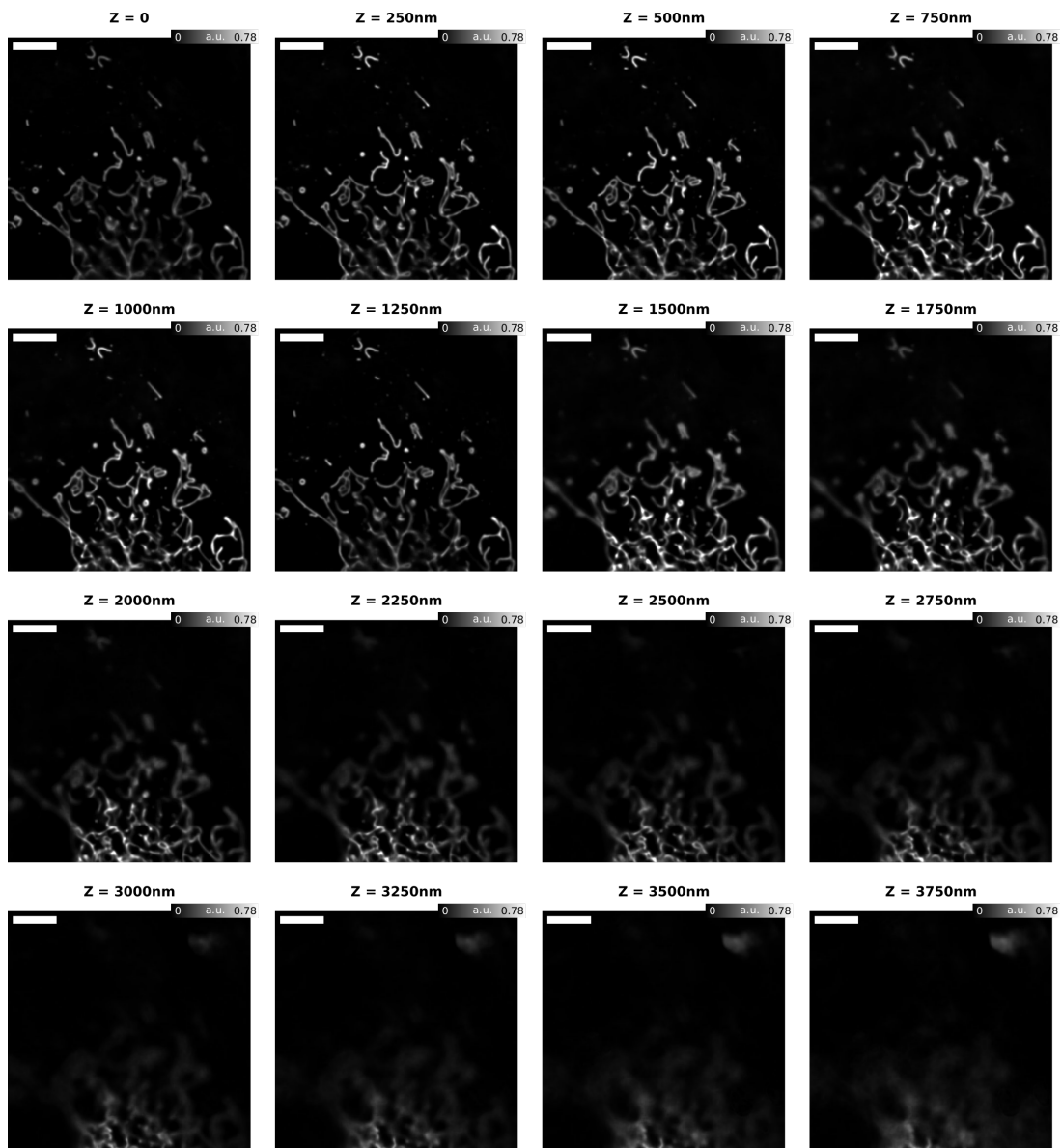


FIGURE 4.14 – Prédiction de fluorescence déconvoluée pour la cellule dont la fluorescence réelle est décrite dans la figure 4.13 après entraînement d'un modèle 3D complexe. Notons la très bonne correspondance avec la fluorescence réelle obtenue avec cet entraînement. Échelle : $10\mu m$.

La qualité de reconstruction de la fluorescence déconvoluée sur les piles d'images du jeu de données est très bonne (Figure 4.15). L'ajout de cette étape de déconvolution rejette beaucoup du signal de fond des images de fluorescence provenant des couches hors focus. Ce signal était intéressant en deux dimensions car il mettait en valeur de l'information de fluorescence en profondeur qui était détectable avec notre acquisition des composantes de phase et d'intensité car elle porte intrinsèquement cette information de profondeur. En passant à l'utilisation de modèles en trois dimensions, le besoin de retrouver ce signal de fluorescence hors champ n'a plus lieu d'être, étant donné que les couches dont il provient sont présentes dans la pile d'images et vont donc être reconstruites. On ne perd donc pas de signal, on élimine seulement un aspect redondant du signal dans les différentes couches et de ce fait le rapport signal utile sur bruit est amélioré. On peut voir sur la figure 4.14 qu'il est possible de suivre la morphologie de mitochondries individuelles en trois dimensions, ce qui était un de nos objectifs initiaux.

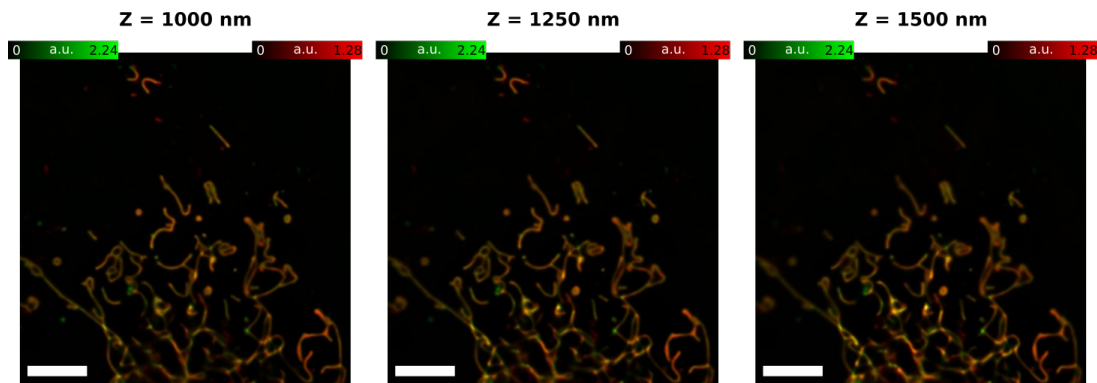


FIGURE 4.15 – Représentation double canaux de la fluorescence réelle déconvoluée (vert) visible dans la figure 4.13 et de la fluorescence prédite (rouge) illustrée dans la figure 4.14. Les éléments ressortant en orange sont les éléments co-localisés. Échelle : $10\mu m$.

Nous avons entraîné des modèles sur les mêmes jeux de données pour des données d'entrée non plus complexes mais contenant les composantes d'intensité ou de phase seules. De manière surprenante, les résultats pour les entraînements ne possédant qu'une des deux composantes comme données de signal sont équivalents en qualité visuelle aux entraînements réalisés sur données complexes. Une illustration des résultats des différents modèles avec les métriques de caractérisation d'erreur quadratique moyenne et de coefficient de corrélation de Pearson sont illustrés sur la figure 4.16. On peut voir sur cette figure que les différences entre les modèles sont relativement minimes, le traitement tendant à homogénéiser les qualités de reconstruction pour toutes les cellules (l'étalement de l'histogramme est réduit par rapport à l'intensité ou la phase seule). On peut en conclure que l'approche complexe permet une moins grande instabilité face aux cas particuliers.

Il est important de noter que les calculs de caractérisation en trois dimensions que j'ai utilisés sont une évolution directe des calculs utilisés pour la caractérisation en deux dimensions (Chapitre 3.3.4). Ces métriques ne sont sûrement

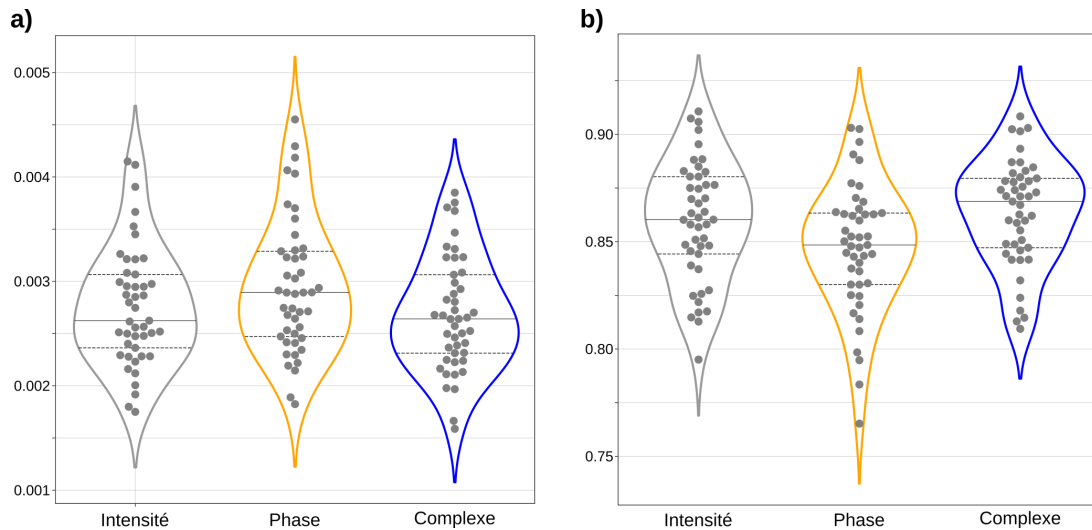


FIGURE 4.16 – Caractérisation des prédictions pour des modèles entraînés sur des jeux de données d'intensité seule, de phase seule et d'intensité et phase en relation complexe. (a) Erreur quadratique moyenne entre piles de fluorescence prédite et réelle déconvoluée. (b) Coefficient de corrélation de Pearson pour les mêmes données.

plus très adaptées dans le cas des images en trois dimensions. En effet la quantité de signal utile comparé au fond est fortement réduite comparée aux images en deux dimensions et peut donc fausser les dynamiques comparatives. Nous n'avons pas pris le temps d'adapter ces métriques pour les modèles en trois dimensions dans cette étude, mais ce sera sûrement un passage obligé dans les développements futurs.

Les prédictions des modèles n'utilisant que les composantes d'intensité ou de phase donnent des résultats plus ou moins équivalents à ceux des modèles entraînés sur les données complexes. On peut donc envisager de n'utiliser qu'une des deux composantes au lieu de la relation complexe et ainsi gagner un temps de calcul significatif pour nos entraînements. Cependant, comme on l'a vu auparavant, la donnée complexe peut amener un avantage qualitatif dans des zones particulières des cellules. Il sera donc nécessaire pour les applications concrètes de réaliser un compromis en fonction de l'objectif à atteindre pour les biologistes et des contraintes de temps et de puissance de calcul.

Réticulum endoplasmique

Nous avons également effectué des entraînements sur des données de fluorescence déconvoluée provenant du réticulum endoplasmique. Un exemple de résultat atteint avec ces entraînements est visible sur la figure 4.17. On peut voir sur les images prédites que, comme c'était déjà le cas pour les modèles entraînés en deux dimensions, nos modèles arrivent à prédire correctement les basses fréquences et détectent l'emplacement du réticulum ainsi qu'une structure grossière, mais n'arrivent pas du tout à reconstruire les hautes fréquences. Ce problème est lié à la taille des éléments fins du réticulum endoplasmique qui ne sont pas résolus dans nos images de phase, et donc invisibles à l'oeil et

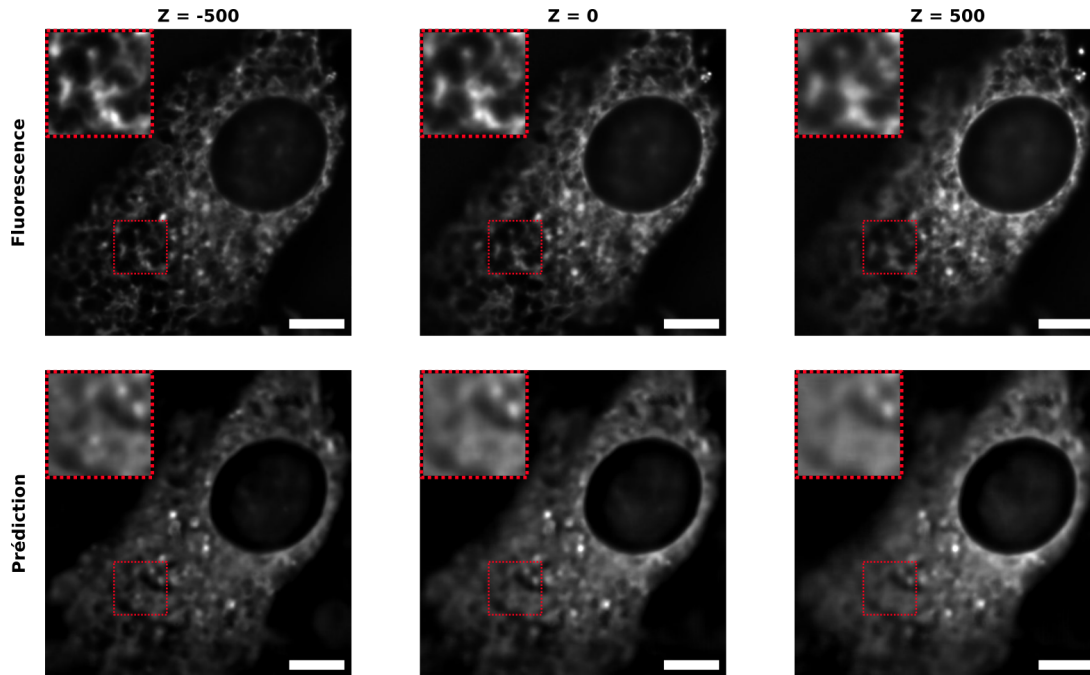


FIGURE 4.17 – Résultats de l'entraînement d'un modèle sur la fluorescence déconvoluée du réticulum endoplasmique en trois dimensions. Pour des raisons de lisibilité, seules trois couches sont représentées. Les intensités de fluorescence ont été normalisées. Échelle : $10\mu m$.

compliqués voire impossible à extraire pour notre modèle. Nos prédictions de basses fréquences se rapprochent néanmoins d'images pouvant être exploitées par nos collaborateurs biologistes, et une discussion devra avoir lieu avec eux afin de déterminer le besoin ou non ainsi que les axes principaux d'amélioration. Nous avons également commencé à explorer certaines pistes utilisant des métriques d'apprentissage de nos modèles séparant hautes et basses fréquences. Ces travaux sont encore à un stade initial et seront discutés plus en détail dans le chapitre 5.2.

4.4 Propagation numérique

Les caractéristiques de notre mesure de microscopie quantitative de phase (Chapitre 4.1), avec l'acquisition du champ électromagnétique nous permettent d'obtenir des informations en profondeur dans notre échantillon à partir d'une acquisition d'un seul plan. Il est alors possible de calculer numériquement l'effet de la propagation des ondes dans l'échantillon et ainsi retrouver l'état du champ dans un plan différent de celui d'acquisition. Nous décrirons dans ce chapitre la théorie liée à cette propagation numérique ainsi que des résultats de son application sur nos images d'échantillons biologiques.

4.4.1 Théorie

La phase et l'intensité du champ électromagnétique ne sont pas des variables indépendantes respectivement au plan d'imagerie, elles sont liées en quadrature (Figure 4.1). Ce lien peut être décrit par les équations de transport de l'intensité (TEAGUE, 1985) reliant la phase et l'intensité au plan axial :

$$u(r, z) = \sqrt{I(r, z)}.e^{i\varphi(r, z)}. \quad (4.1)$$

Avec :

- $r(x, y)$: les coordonnées latérales,
- z : la coordonnée axiale,
- I : l'intensité du champ EM,
- φ : la phase du champ EM.

Si on considère la propagation d'une onde cohérente dans l'espace libre, on peut noter :

$$\left(i\frac{\delta}{\delta z} + \frac{\nabla^2}{2k} + k\right)u = 0. \quad (4.2)$$

Avec :

- ∇ : le gradient latéral,
- $k = 2\pi/\lambda$: la norme, du vecteur d'onde.

En combinant ces deux équations on obtient :

$$e^{i\varphi} \left[\begin{array}{l} \frac{i}{2\sqrt{I}} \cdot \frac{\delta I}{\delta z} - \frac{\delta \varphi}{\delta z} \sqrt{I} + \\ \frac{1}{2k} \left(\frac{\nabla^2 I}{2\sqrt{I}} - \frac{(\nabla I)^2}{4I\sqrt{I}} + i \frac{\nabla \varphi \nabla I}{\sqrt{I}} + i\sqrt{I} \nabla^2 \varphi - \sqrt{I} (\nabla \varphi)^2 \right) + \\ k\sqrt{I} \end{array} \right] = 0. \quad (4.3)$$

En combinant l'équation (4.3) par u^* , le complexe conjugué de u , on peut obtenir des relations les dérivées axiales de phase ou d'intensité et leurs gradients latéraux :

$$\left\{ \begin{array}{l} (4) \times u^* - (4)^* \times u \Leftrightarrow \frac{\delta I}{\delta z} = -\frac{1}{k} \nabla (I \nabla \varphi) \\ (4) \times u^* + (4)^* \times u \Leftrightarrow \frac{\delta \varphi}{\delta z} = \frac{\nabla^2 I}{4kI} - \frac{(\nabla I)^2}{8kI^2} + \frac{I \nabla^2 \varphi}{2kI} + k \end{array} \right. \quad (4.4)$$

La première partie de cette équation est très utilisée en imagerie de phase quantitative afin de retrouver la phase à partir de mesures d'intensité (BARTY, 1998). Cela permet d'expliquer en partie pourquoi les résultats de prédiction 3D sont à peu près identiques en utilisant l'intensité (ou la phase) 3D seule ou le champ électromagnétique 3D.

Dans notre cas, avec les mesures de phase et d'intensité dans un plan donné, nous pouvons réaliser une propagation numérique et retrouver les composantes de phase et d'intensité dans d'autres plans grâce à ces formules de propagation (BON, BOURG, 2015). On peut ainsi reconstruire une pile d'images en profondeur numériquement à partir d'une acquisition de phase et d'intensité dans un plan donné. Cette application présente des limites lorsque l'on cherche à propager "loin", mais présente un intérêt certain dans les plans "proches" de celui de départ, ces notions de "proche" et "loin" étant intimement liées à l'ouverture numérique d'illumination et au rapport signal à bruit des objets.

4.4.2 Analyse de propagation

Nous avons appliqué un algorithme de calcul de propagation à des images d'intensité et de phase issues d'une pile d'images acquises expérimentalement. Ces piles expérimentales correspondent à 21 couples intensité/phase mesurés avec des différences de profondeur de $250nm$ (équivalent à la moitié de la profondeur de champ en fluorescence de façon à respecter le critère de Nyquist/Shannon) afin de reconstruire correctement une pile 3D de $5\mu m$ d'épaisseur.

Analyse visuelle

La comparaison entre les images d'intensité et de phase mesurées et leurs équivalentes propagées numériquement à partir d'un plan donné sont illustrés dans la figure 4.18 pour une ouverture numérique d'illumination de 0.25 et une ouverture numérique de collection de 1.4. Cette figure montre les effets de la

propagation numérique dans les deux sens de profondeur. On peut voir que les images propagées numériquement sont très proches de celles mesurées expérimentalement, notamment dans pour les éléments qui nous intéressent tout particulièrement : les mitochondries.

Ainsi, si on s'attarde sur les zones zoomées, on peut voir une très bonne correspondance des mitochondries en phase, notamment la principale en forme de "v" sur la partie droite (flèches vertes) qui ressort très bien en phase dans les plans $Z=-500, 0, 500$ et qui n'est quasiment plus visible en -1000 et 1000 . Notons que la disparition de cette mitochondrie en profondeur est sensiblement similaire dans ses résidus entre les images mesurées et celles calculées. On notera également pour cette même mitochondrie une présence continue en intensité sauf dans son plan d'imagerie ($Z=0$) où elle est très peu visible comme attendu pour un objet de phase pur (Figure 4.1b). On notera également le changement de signe des valeurs d'intensité de cette mitochondrie (passage du blanc au noir) en fonction de sa position par rapport au plan d'imagerie.

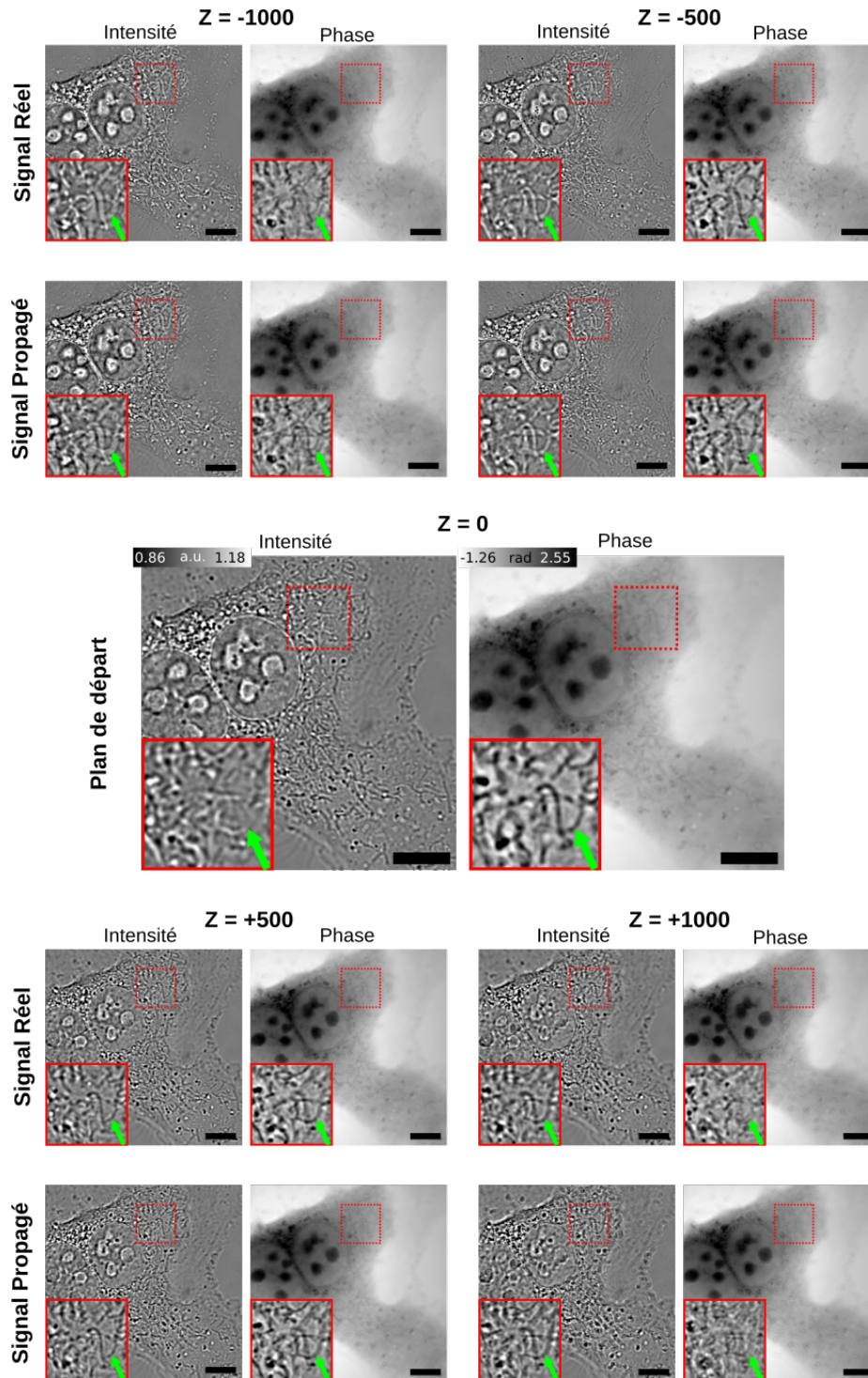


FIGURE 4.18 – Comparaison entre une pile d’images mesurée expérimentalement et calculée numériquement par propagation à partir d’un plan donné. L’image de départ en $Z=0$ est commune aux deux piles. La zone en rouge est un zoom d’une partie de la cellule contenant des mitochondries. La partie rouge en bas à gauche des images est un zoom d’une partie (pointillés rouges) de l’image parente. Notons le changement de couleur de certaines mitochondries en fonction du plan d’imagerie alors qu’elles restent de valeurs équivalente en phase et deviennent progressivement floues. Pour des raisons de lisibilité, les échelles d’intensité ne sont visibles que sur les images de départ. Elles sont identiques pour l’ensemble des autres images. Échelle : $10\mu m$.

La propagation numérique sur nos images d'intensité et de phase fonctionne très bien pour nos cellules, que ce soit au niveau des noyaux ou du cytoplasme. La reconstruction des mitochondries est très fine, en particulier pour des propagations peu profondes. En effet, plus on propage loin du plan de départ, plus des artefacts vont apparaître sur les images propagées. Un des plus caractéristique est la formation d'un halo issu d'éléments circulaires qui diverge de la réalité pour des grandes propagations.

La figure 4.19 montre les images d'intensité et de phase propagées sur $3\mu m$ à partir du même plan de départ que dans la figure 4.18 et leur équivalent mesuré expérimentalement. On voit clairement que ces figures divergent, en particulier sur l'intensité, avec l'apparition d'artefacts et une difficulté certaine à retrouver des éléments situés trop loin du plan initial. Cependant, une propagation de $\pm 3\mu m$ correspond à 12 fois la profondeur de champ de l'imagerie de fluorescence, ce qui est très important.

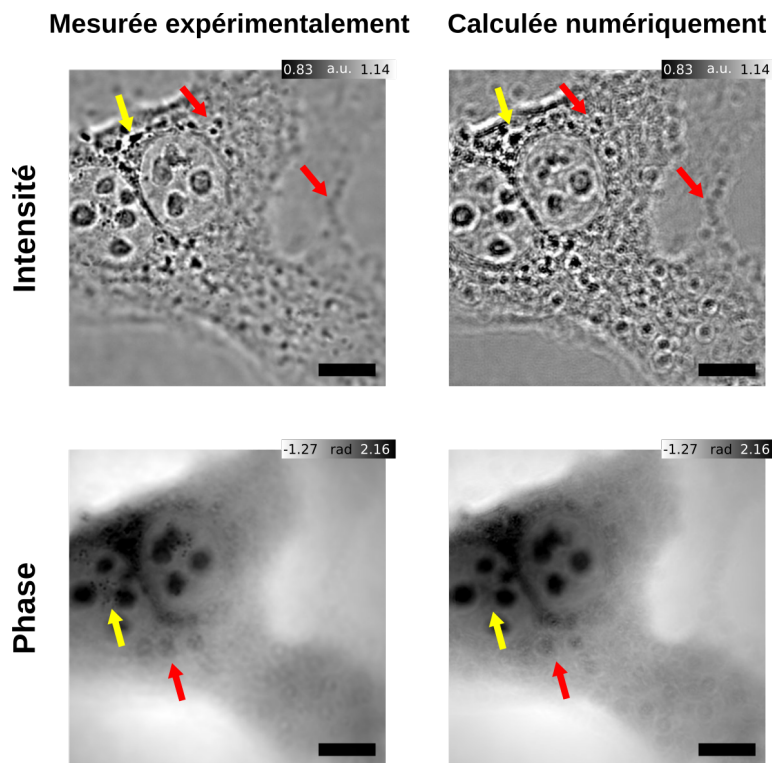


FIGURE 4.19 – Comparaison entre un couple d'images d'intensité et de phase mesurées expérimentalement et les images d'intensité et de phase propagés numériquement depuis un plan situé $3\mu m$ plus bas. On remarquera la difficulté à retrouver des éléments correctement imagés dans cette couche (flèches jaunes) et l'apparition d'artefacts de type halos liés à la trop grande propagation. Échelle : $10\mu m$.

Caractérisation

Nous avons réalisé des mesures afin de caractériser la différence entre les piles d'images réelles obtenues expérimentalement et des piles reconstruites numériquement par propagation à partir d'un plan de la cellule présentant un grand

nombre de mitochondries. Nos cellules étant étalées, ce plan se situe près du bas des cellules et nous avons donc plus de points mesurés (et calculés) en dessous qu'au dessus. Cette caractérisation a été réalisée sur 386 piles 3D.

La figure 4.20.a montre les mesures de coefficients de corrélation de Pearson et la mesure de similarité structurelle entre les piles réelles et propagées numériquement pour la composante d'intensité. On remarque une très bonne similarité structurelle entre les deux modalités et une décroissance avec la profondeur relativement lente. Ces bons résultats peuvent s'expliquer en partie sur le fait que la structure globale des cellules est conservée sur l'ensemble des images constituant la pile. En ce qui concerne la corrélation de Pearson, on a une décroissance plus marquée sur les débuts avant stabilisation dans les couches éloignées de celle de départ, ce qui est logique si on considère que les zones extrêmes possèdent moins d'éléments caractéristiques pouvant influencer sur cette mesure.

Si on compare ces résultats aux calculs de corrélation et de similarité structurelle au sein d'une même cellule entre la couche de départ $Z=0$ et les autres couches mesurées expérimentalement (Figure 4.20.b), on peut voir une perte plus importante de similarité structurelle une fois que l'on s'éloigne du plan de départ avec une stabilisation aux extrêmes avec la présence principalement de hautes fréquences. En ce qui concerne la corrélation de Pearson, on a une chute drastique des valeurs tendant vers une décorrélation complète et des valeurs aux extrêmes autour de 0. Ces valeurs sont à mettre en regard des différences entre pile mesurée et pile propagée. Même si on perd en précision en passant par la propagation numérique, on garde quand même des valeurs, en accord avec les observations visuelles, laissant entrevoir une similitude suffisante pour que les données propagées numériquement puissent se substituer à l'acquisition complète.

Nous avons également calculé la corrélation entre des cellules prises deux à deux aléatoirement au sein du jeu de données. Les coefficients de corrélation de Pearson se situaient entre -0.05 et 0.05 quelles que soient les paires de cellules et quelles que soient les profondeurs (Données non représentées). Ces mesures montrent bien une décorrélation totale entre deux cellules prises aléatoirement et renforcent la pertinence de notre méthode de propagation.

En ce qui concerne les composantes de phase, on constate sur la figure 4.20.c mesurant de manière équivalente à la figure 4.20.a la corrélation et la similarité structurelle entre les éléments de phase mesurés et calculés, que la corrélation de Pearson est très bonne autour du Z de départ puis chute légèrement et se stabilisé au-delà d'un micron (dans le deux sens). Ceci peut s'expliquer par le fait que la majorité des informations hautes fréquences en phase soient contenue dans les plans où les éléments biologiques sont correctement imagés, dans notre cas avec des cellules aplaties les quelques couches contenant des mitochondries ou autres organelles visibles. Pour ce qui est de la similarité structurelle, on remarque une décroissance assez forte entre images propagées et mesurées qui est liée à la perte de structures clairement visibles alors que l'on s'éloigne du

plan de départ.

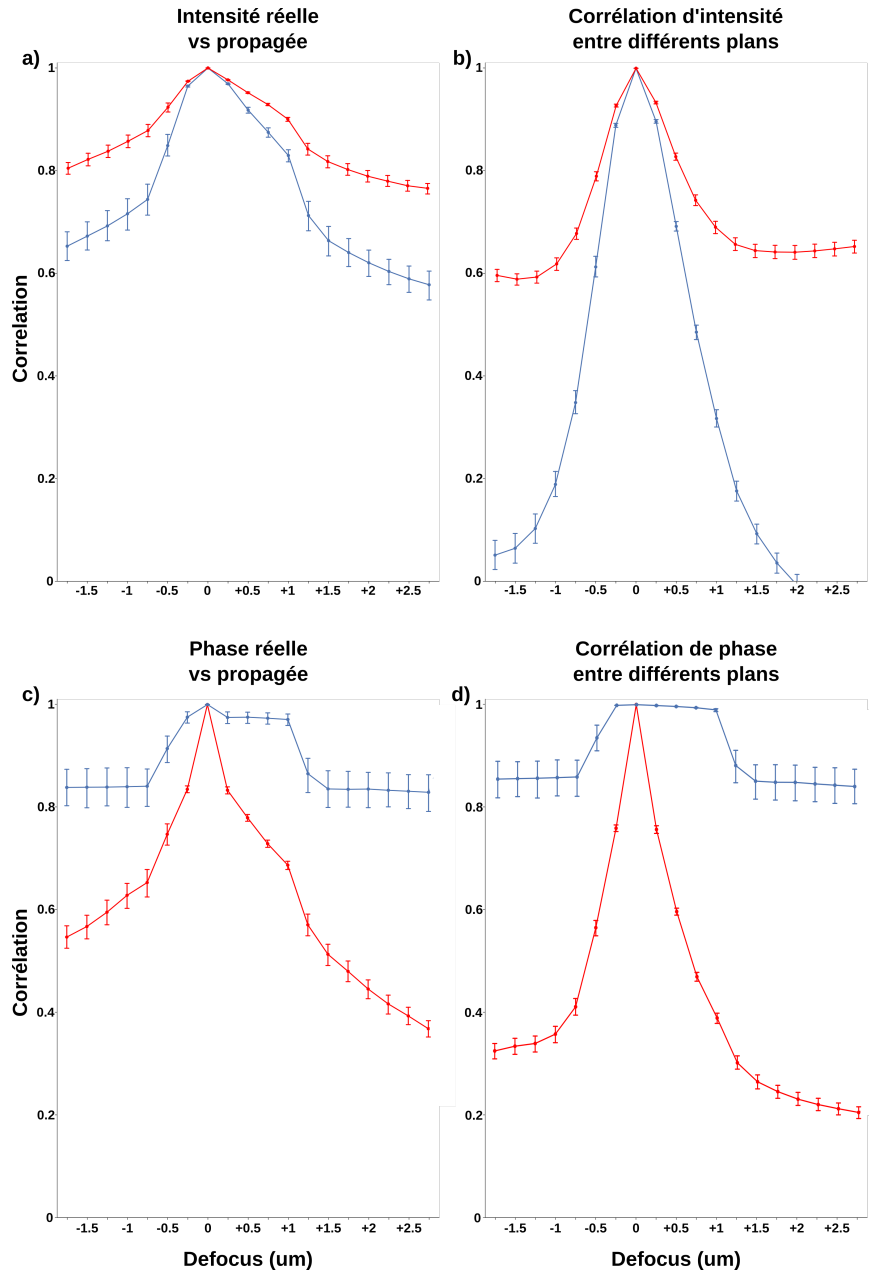


FIGURE 4.20 – Étude sur un jeu de piles 3D expérimentales et comparaison avec une pile 3D reconstituée par propagation numérique. Coefficients de corrélation de Pearson (Bleu) et indice de mesure de similarité structurelle (SSIM)(Rouge) des composantes d'intensité des piles réelles et propagées (a). Coefficients de Pearson et SSIM pour les composantes d'intensité d'une pile 3D expérimentale comparée à l'image $Z=0$ (b). Cette mesure est donnée comme référence pour les niveaux de corrélation. Équivalents pour les composantes de phase (c, d). $N=386$.

Si on compare ces valeurs aux corrélations et similarités structurelles au sein d'une même cellule (Figure 4.20.d), on retrouve des mesures similaires pour la corrélation pour les raisons évoquées plus haut. La similarité structurelle décroît fortement avec la profondeur.

Étant données les ouvertures numériques d'illumination et de collection, une propagation sur plus ou moins $1\mu m$ sera très fidèle, et commencera à être moins bonne sur plus ou moins $2\mu m$. On peut donc espérer une reconstruction en trois dimensions à partir de données en deux dimensions sur une profondeur de champ de l'ordre de 4 à 8 fois la profondeur de champ de la fluorescence.

4.5 Applications de la propagation numérique

L'utilisation de la propagation numérique apportée en complément de l'imagerie de microscopie quantitative de phase par interférométrie à décalage quadrilatéral peut nous permettre de nous affranchir des contraintes liées à l'acquisition de données en trois dimensions, à savoir principalement le temps d'acquisition du aux déplacements dans les différentes couches qui peut induire des changements d'états ou de positions des éléments intra-cellulaires entre l'acquisition des couches basses et hautes.

Dans l'idéal il faudrait une acquisition instantanée du signal en trois dimensions. Dans la pratique où on reconstruit le signal en trois dimensions à partir d'une pile d'images acquises à différentes profondeurs, il faudrait une acquisition instantanée de toutes les couches formant la pile. L'utilisation de la propagation numérique sur une image en deux dimensions pour reconstruire une pile en trois dimensions permet d'atteindre cet état. En effet, on a seulement besoin d'une acquisition du champ électromagnétique dans un plan qui se fait en moins de 10 ms. La reconstruction numérique du volume peut être effectuée ensuite sans contrainte de temps et être suivie de la prédiction de fluorescence.

4.5.1 Prédiction volumique depuis une acquisition 2D

Notre technique de microscopie nous permet d'acquérir un grand nombre d'images sans être invasifs pour l'échantillon observé. Afin d'effectuer les observations les plus fidèles possibles il est donc intéressant d'acquérir les images à la meilleure fréquence possible et donc de n'être limité que par la vitesse d'acquisition de la caméra ($\sim 100Hz$). Cet état est atteint si on réalise uniquement des acquisitions d'un plan sans avoir à se déplacer en profondeur.

On effectuera ensuite la propagation numérique de ces images afin de reconstruire la pile d'images à partir de laquelle on effectuera la reconstruction volumique du signal de fluorescence.

Mise en oeuvre

Dans le but de réaliser une prédiction en trois dimensions du signal de fluorescence provenant des mitochondries (ou du réticulum endoplasmique le cas échéant) il nous faut un modèle capable de réaliser de telles prédictions en trois dimensions. Nous pouvons donc utilisé deux approches pour obtenir ces capacités de prédictions volumiques. La première ainsi que les résultats obtenus est présentée dans ce chapitre, et la seconde sera évoquée dans le chapitre 5.2.

Une des façons d'obtenir des capacités de prédiction volumiques est d'utiliser un modèle en trois dimensions entraîné comme pour le chapitre 4.3.4 sur des données en trois dimensions, que ce soit pour le signal complexe d'intensité et de fluorescence comme pour la cible de fluorescence déconvoluée (Figure 4.21). Nous avons réalisé des entraînements à partir des données en trois dimensions acquises expérimentalement mais également sur des piles reconstruites par pro-

propagation à partir d'une couche "centrale" située dans la zone de présence forte de l'élément à reconstruire (mitochondries ou réticulum).

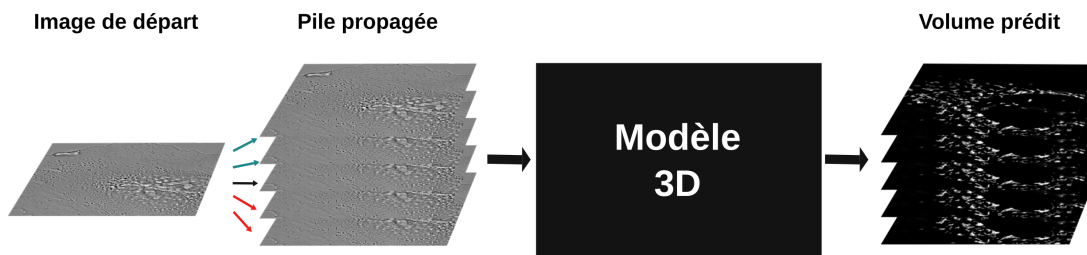


FIGURE 4.21 – Technique employée pour la prédiction de fluorescence à partir d'une pile d'images propagées. Pour des raisons de lisibilité, seuls la composante d'intensité et cinq couches de profondeur de pile sont représentées. A partir d'une image 2D de départ, on réalise une propagation positive (flèches vertes) et négative (flèches rouges) pour reconstruire une pile 3D. On passe ensuite dans un modèle prédictif 3D pour obtenir la pile prédite.

Résultats

Nous avons réalisé une propagation numérique à partir d'une couche "centrale" afin d'aller d'une couche à $-1750nm$ à une couche à $+3000nm$ et avons entraîné notre modèle en trois dimensions sur ces données avec comme objectif la reconstruction de fluorescence déconvoluée. Les résultats de cet entraînement pour une prédiction sur une pile du jeu de données de test sont visibles sur la figure 4.22. La cellule mise en valeur dans cette figure est très chargée en mitochondries dans le volume étudié et permet de se rendre compte de la qualité de reconstruction ainsi que de mettre en lumière des zones caractéristiques problématiques.

On remarque une très bonne correspondance générale dans les zones périphériques de la cellule peu chargées où les mitochondries sont correctement reconstruites jusque dans des couches lointaines ($\pm 1.5\mu m$). Pour les zones proches du noyau très denses en signal, on observe une bonne détection à mesure que l'on s'éloigne de la couche de départ, avec cependant une moins bonne netteté que celle attendue. On remarque également dans les couches hautes ($+1500nm$ et $+2000nm$) une difficulté à reconstruire les mitochondries. A noter que la forme caractéristique de cette cellule assez peu étalée n'est pas particulièrement favorable à notre technique de reconstruction par propagation numérique, ce qui constitue donc un challenge supplémentaire.

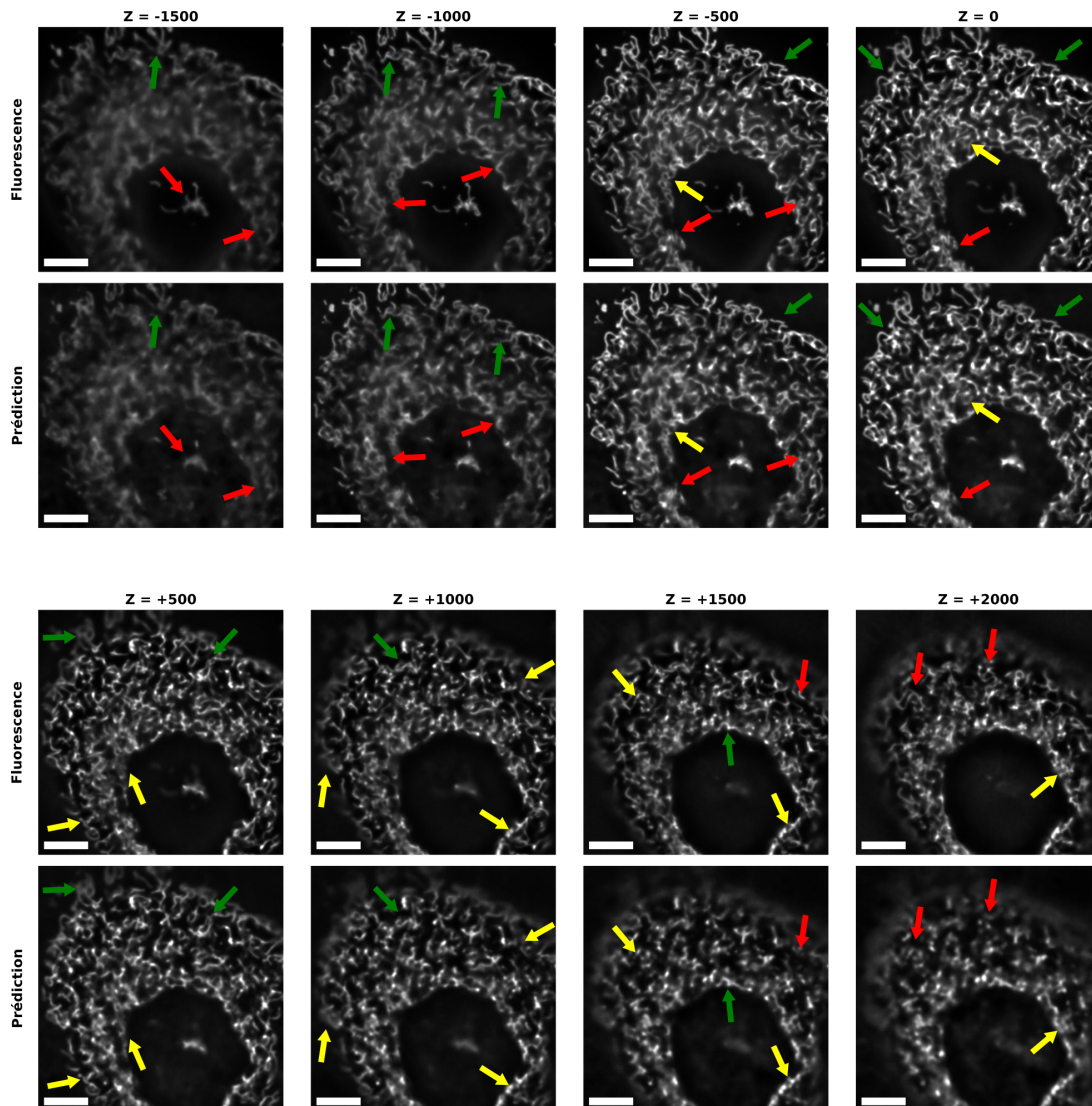


FIGURE 4.22 – Utilisation d'un entraînement de modèle complexe sur les données d'intensité et de phase propagées. Comparaison entre fluorescence réelle et fluorescence prédite pour la reconstruction de mitochondries. La cellule représentée a une forme plus sphérique que la normale et permet d'illustrer des zones présentant des problèmes de reconstruction. Sont mises en valeur des zones de très bonne reconstruction (flèches vertes), des zones de reconstruction correcte mais moins bien définies que la cible (flèches jaunes) et des zones pour lesquelles le modèle peine à reconstruire la fluorescence (flèches rouges). Échelle : $10\mu m$.

L'utilisation de la propagation numérique présente aussi une source de divergence avec la cible de fluorescence acquise expérimentalement. En effet, la propagation est réalisée à partir d'une image donnée et simule une acquisition instantanée de la pile d'images, alors que l'acquisition de fluorescence qui nous sert de cible pour les entraînements est réalisée expérimentalement avec un décalage temporel entre les différentes couches. Ainsi, plus on s'éloigne de la couche de départ, plus les cibles peuvent avoir bougé par rapport au plan de référence et donc induire des erreurs ou décalages de prédiction.

Nous avons réalisé des entraînements similaires sur données propagées pour les composantes d'intensité et de phase seules afin de voir si nous pouvions être en mesure d'atteindre des résultats similaires à ceux utilisant les deux composantes en relation complexe. La comparaison entre les coefficients de corrélation des piles d'images obtenues par prédiction avec la fluorescence cible sont visible sur la table 4.1. On voit que l'on obtient de meilleurs résultats en utilisant la composante complexe plutôt que l'une des composantes d'intensité ou de phase isolées. Ceci confirme l'intérêt de l'utilisation de cette composante complexe pour obtenir des résultats de qualité dans les prédictions, *a fortiori* pour les études utilisant des données propagées numériquement. Les images des piles prédites par les différents modèles (non illustrées) sont en accord avec cette caractérisation et confortent notre conclusion. On reste cependant moins bon en utilisant des piles calculées par propagation numérique que des piles obtenues expérimentalement. Reste à déterminer si cette perte de justesse au profit de la fréquence d'acquisition est un problème pour les applications des biologistes.

TABLE 4.1 – Caractérisation des modèles sur données propagées.

	RMSE	Pearson	Dice	Jaccard	SSIM
Intensité propagée	0.069 ±0.023	0.682 ±0.083	0.077 ±0.062	0.24 ±0.16	0.60 ±0.13
Phase propagée	0.062 ±0.025	0.740 ±0.070	0.080 ±0.062	0.22 ±0.16	0.63 ±0.14
Complexe propagé	0.056 ±0.012	0.786 ±0.057	0.078 ±0.036	0.25 ±0.13	0.760 ±0.081
Complexe réel	0.0516 ±0.0075	0.859 ±0.041	0.075 ±0.026	0.31 ±0.19	0.722 ±0.065

4.5.2 Conclusions

Nous avons en substance réussi à reconstruire un volume prédit en fluorescence en trois dimensions à partir d'une image seule en deux dimensions. Cette reconstruction est très bonne sur une profondeur de $\pm 1\mu m$ (4 fois la profondeur de champ) et correcte sur une profondeur de $\pm 2\mu m$ (8 fois la profondeur de champ).

Si on prend le cas de cellules typiques fibroblastes étalées, on obtient une prédiction très fine de fluorescence en trois dimensions, même pour des couches éloignées de $2\mu m$ de l'image d'origine (Figure 4.23). Ce genre de reconstruction numérique permet de n'avoir à collecter que des images de microscopie de phase en deux dimensions (technique non-invasive avec une fréquence d'acquisition limitée uniquement par la caméra) pour reconstruire un volume de fluorescence provenant de mitochondries suffisamment bien définies pour pouvoir les analyser morphologiquement.

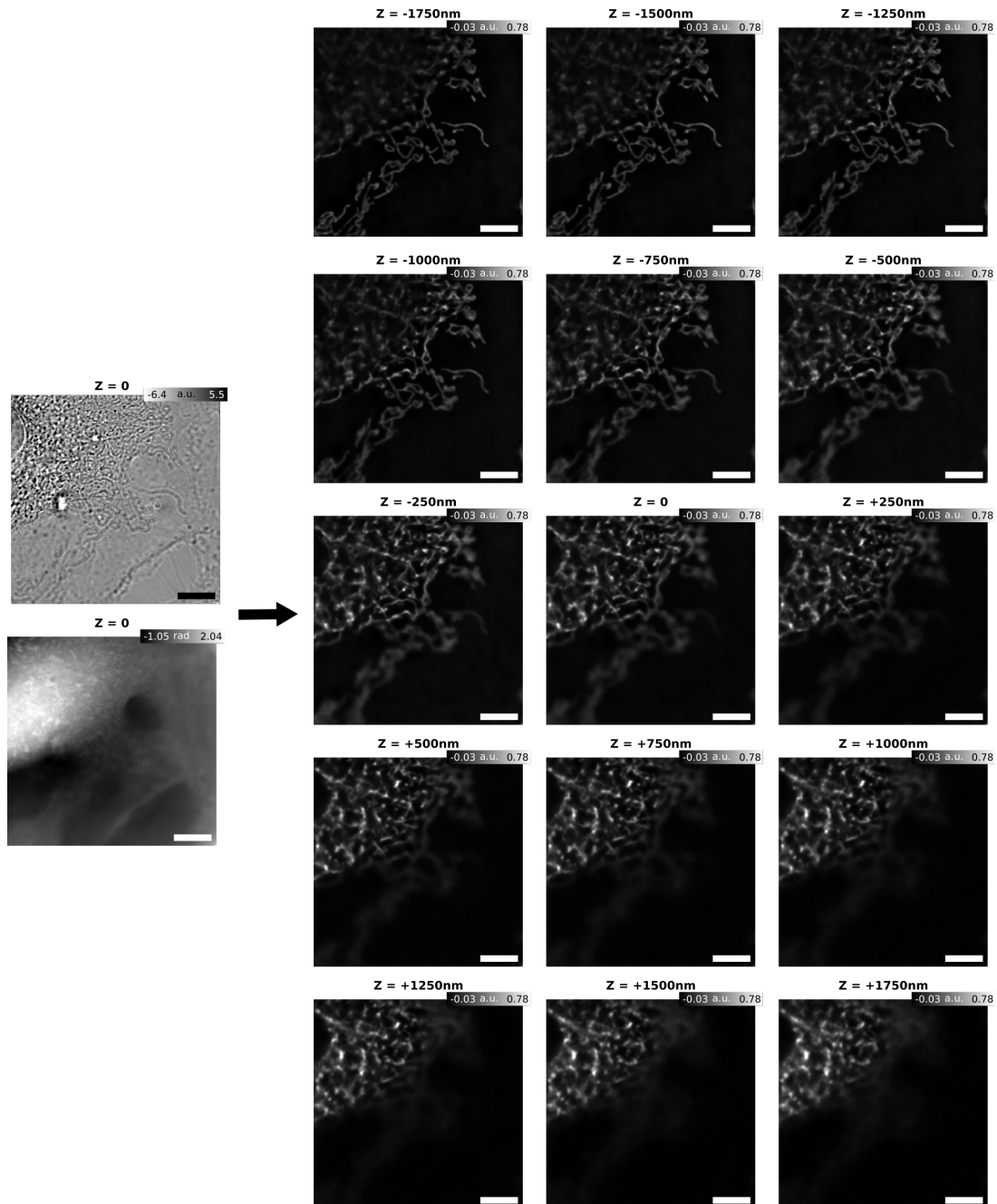


FIGURE 4.23 – Illustration des résultats de prédiction de fluorescence en trois dimensions à partir d'une acquisition d'intensité et de phase en deux dimensions. Échelle : $10\mu m$.

4.6 Analyse critique et perspectives

Le passage aux données en trois dimensions a permis l'accès aux informations de fluorescence dans l'ensemble des cellules et non plus dans un seul plan. Le passage en trois dimensions a surtout permis l'utilisation de la déconvolution sur les signaux de fluorescence et donc un meilleur rapport signal sur bruit pour les cibles à atteindre et un entraînement qui s'en est vu facilité.

Les modèles entraînés sur la fluorescence déconvoluée provenant de mitochondries fournissent des résultats très proches à l'oeil nu de l'objectif à atteindre. De plus, la relation entre les signaux d'intensité et de phase en profondeur nous permet également d'obtenir de bonnes prédictions avec des entraînements réalisés uniquement sur la composante d'intensité ou sur celle de phase en trois dimensions. La différence de temps d'entraînement avec les mêmes paramètres entre un modèle sur les données complexes en trois dimensions et sur la composante d'intensité (ou de phase) seule est d'un facteur 2 à 2.5. Même si le temps d'entraînement n'a pas été rédhibitoire dans nos études, une discussion sur l'intérêt de complexifier les modèles afin d'obtenir un gain marginal, mais une meilleure robustesse sur n'importe quelle cellule, dans la qualité de prédiction est nécessaire.

En ce qui concerne l'utilisation de la propagation numérique pour reconstituer des piles en trois dimensions, comme on observe des dégradations au-delà d'un micron de propagation, on peut également envisager de réaliser une prédiction volumique à partir d'une acquisition sous-échantillonnée. En effet, en réalisant une acquisition d'une pile d'images non plus espacées en profondeur de $250nm$ pour le critère de Nyquist/Shannon (Chapitre 4.3.1) mais de $2\mu m$, on peut réaliser des propagations moins profondes depuis ces images et réaliser des combinaisons afin de reconstituer les couches manquantes et reconstruire une pile complète. On obtient ainsi, dans le cas d'une acquisition tous les deux microns une pile complète avec huit fois moins d'images acquises (et donc une vitesse d'acquisition huit fois plus rapide) tout en gardant une bonne justesse dans la propagation.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

5.1 Avancées réalisées

J'ai présenté différentes stratégies pour permettre la prédiction au moyen d'algorithmes d'apprentissage profond d'images de fluorescence à partir d'une imagerie sans marquage. Cette imagerie bien spécifique est basée sur la mesure de l'intensité et de la phase de la lumière. J'ai présenté les différentes étapes ayant mené de l'idée de départ aux résultats finaux en 2D et 3D. Finalement, j'ai étudié comment, à partir d'une simple acquisition 2D de phase et d'intensité, on pouvait prévoir une reconstruction 3D d'images de fluorescence.

5.1.1 Évolutions technologiques

A l'origine de ces travaux de thèse, notre équipe ne possédait qu'une expertise en microscopie quantitative de phase et un désir de réaliser des développements pouvant être utiles à nos collaborateurs biologistes sur cette modalité. Nous avons au cours de ces travaux acquis une expertise sur les techniques d'apprentissage machine et d'apprentissage profond afin de pouvoir développer des algorithmes spécifiques à nos types de données et permettant une reconstruction de fluorescence.

Cette thèse étant fondatrice dans notre groupe, et plus généralement dans le domaine de la microscopie quantitative, je suis parti d'un modèle d'algorithme U-net standard pour l'appliquer à des données de phase seule couplées à des acquisitions de fluorescence pour les cibles. Cette étape aura permis une prise en main du fonctionnement de l'algorithme, avec une plongée au coeur de l'algorithme pour en comprendre tous les rouages et pouvoir ensuite les faire évoluer pour des tâches de plus en plus spécifiques à notre mesure quantitative sur données particulières.

Modèle 2D

Les premières évolutions du modèle ont consisté à en modifier les différents éléments afin de pouvoir prendre en compte des données d'entrée complexes

typiques de nos acquisition de champ électromagnétiques. Les changements ont concerné principalement la gestion des données en entrée de l'algorithme et les différents modules de calcul composant l'architecture du modèle U-net pour qu'ils soient à même de traiter des données complexes.

J'ai ainsi développé, à partir d'une bibliothèque existante développée par S.Popoff, les évolutions des blocs de convolution, des fonctions d'activation ainsi que des fonctions de normalisation par lots pour la gestion des données complexes. L'étude d'éléments biologiques denses ou très fins tels que le réticulum endoplasmique m'a également poussé à réfléchir sur les problématiques de métriques d'apprentissage sur mesure et ainsi développer une métrique d'apprentissage basée sur le coefficient de corrélation de Pearson. L'ensemble de ces développements ont été réalisés à partir des bases de la librairie Pytorch avec pour objectif de pouvoir les affiner et à terme les intégrer à cette librairie et ainsi faire profiter l'ensemble de la communauté du résultat de mes travaux.

Modèle 3D

Après avoir validé la qualité et la pertinence de ces évolutions, nous sommes passé à l'évolution des modèles en trois dimensions. En effet, les éléments observés par les utilisateurs de microscopie de fluorescence sont principalement volumiques. L'utilisation de cellules relativement aplaties permettait d'obtenir une approximation correcte pour l'étude en deux dimensions de certaines zones, et ainsi valider nos développements, mais un passage en trois dimensions revêt beaucoup plus d'intérêt pour les recherches biologiques concrètes.

L'architecture retenue au final pour nos études en trois dimensions est visible sur la figure 5.1. Des concessions ont été réalisées pour continuer de réaliser nos développements et entraînements en local.

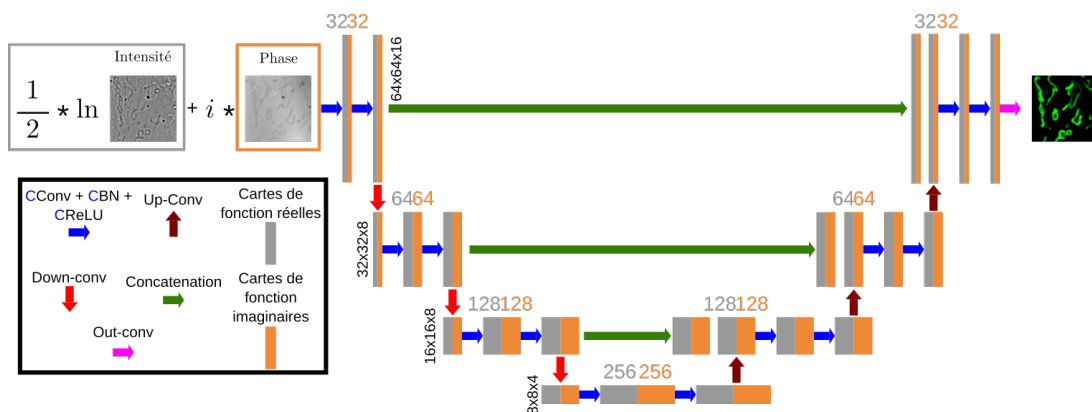


FIGURE 5.1 – Représentation du U-Net complexe en 3D. Pour des raisons de lisibilité, la représentation des images d'entrée et de sortie est en 2D. Le nombre de cartes de fonction réelles et imaginaires à chaque étage sont indiqués respectivement en gris et orange. Les convolutions descendantes et montantes ont été modifiées par rapport à un U-net normal.

L'une des principales limitations en ce qui concerne l'utilisation de notre microscopie de phase est le nombre de couches formant une pile en trois dimensions.

Les piles acquises sur le microscope avaient des tailles de $21 * 498 * 498 \text{ pixel}^3$. Pour une utilisation optimale du U-net 3D, il aurait fallu des tailles équivalentes dans les trois dimensions et ainsi une résolution isotropique, afin de réaliser des réductions de taille dans ces trois dimensions lors de changement d'étage dans le modèle, mais cela n'a pas de sens d'un point de vue optique sur des échantillons fins comme des cellules. Notre nombre d'images en profondeur limité nous a forcé à peu réduire la taille en profondeur, ce qui impacte nécessairement la qualité de prédiction suivant cette direction. Une voie d'amélioration serait de travailler sur des échantillons plus épais mais de nombreux développements expérimentaux auraient été nécessaires et étaient hors du champ d'application de cette thèse.

L'avancée présentant le plus de perspectives d'applications est l'utilisation de la propagation numérique afin de reconstruire les piles d'images à partir d'une simple acquisition d'un interférogramme en deux dimensions. Cette évolution sur le pré-traitement des données nous permet de nous affranchir de l'acquisition en trois dimensions pendant l'étape de prédiction et ainsi gagner potentiellement un facteur 20 sur la vitesse de nos acquisitions, tout en restant non-invasif du fait de la nature de notre technologie d'imagerie de phase quantitative.

Considérations matérielles

Il est important de noter que l'ensemble des développements et tests réalisés pour ces travaux de thèse ont été effectués sur site, avec des ressources informatiques limitées vis-à-vis d'un serveur de calcul. Nous avons pour commencer une carte graphique Nvidia 2080Ti possédant 11GB de mémoire qui nous a permis de réaliser l'ensemble des développements et calculs en deux dimensions et nous sommes passés sur une Nvidia Quadro RTX 6000 possédant 24GB de mémoire pour nos études en trois dimensions. L'utilisation de notre outil nécessite certes des capacités de calcul non négligeables mais tout à fait abordables sur site pour des entraînements et des prédictions ne nécessitant pas l'usage de ressources externes.

L'augmentation de la taille des données devient par ailleurs un vrai problème. Si on ne souhaite pas recourir à des serveurs de calculs, pour différentes raisons allant de la sobriété énergétique à la disponibilité et facilité d'accès, je pense que le maintien des développements sur machine de bureau est un plan important.

Les durées des entraînements pour des jeux de données de 400 cellules sont de l'ordre de 2h30 pour des données en deux dimensions non complexes, de l'ordre de 4h pour des données en deux dimensions complexes, et de l'ordre de 50h pour des entraînements sur données complexes en trois dimensions. En ce qui concerne les prédictions, le temps de prédiction en deux dimensions est une fraction de secondes et la prédiction d'une pile (ainsi que l'enregistrement du résultat) est de l'ordre de quelques secondes actuellement avec un certain nombre de briques de calcul développés en interne n'ayant pas encore reçu d'optimisation poussée pour la réduction du temps de calcul.

5.1.2 Régénération d'éléments biologiques

Les modèles que nous avons développé permettent l'accès à de la reconstruction de fluorescence à partir d'acquisitions de microscopie quantitative de phase, qu'ils soient en deux ou trois dimensions.

Analyse 2D

Il est intéressant d'observer que l'utilisation des données complètes issues du champ électromagnétique, à savoir les composantes d'intensité et de phase en relation complexe apporte une amélioration dans la qualité de prédiction de mitochondries (des objets clairement identifiables sans apprentissage machine) en deux dimensions, en comparaison avec des entraînements réalisés avec uniquement l'une des deux composantes, mais qu'elle est quasiment équivalente à l'utilisation des deux composantes en tant que deux canaux complémentaires d'entrée dans le modèle, pour peu qu'ils soient correctement équilibrés relativement à la théorie du champ électromagnétique. La mise en place des modules complexes dans notre modèle, bien que plus juste d'un point de vue physique, n'apporte qu'un intérêt minime tout en complexifiant le modèle et en augmentant le temps de calcul.

En ce qui concerne des éléments biologiques plus diffus, en l'occurrence le réticulum endoplasmique, l'utilisation des valeurs complexes apporte cependant une amélioration notable dans la qualité de prédiction, tout en restant cependant limitée aux basses fréquences de l'image de fluorescence, ceci étant du *a priori* à un manque de résolution dans les images de phase quantitative. Les premières analyses de colocalisation avec la fluorescence de mitochondries prédite sont cependant encourageantes étant donné que l'on retrouve des zones à forte densité pour les deux éléments.

Il apparaît nécessaire, maintenant que notre outil est développé et performant de le confronter au jugement de biologistes afin de déterminer s'il apporte suffisamment d'éléments pour leurs études et quels sont les points à améliorer le cas échéant. De plus, il est à noter que ces blocs complexes assurent la robustesse et l'exploitation optimale des informations de phase et d'intensité, utiles pour bon nombre d'autres développements de l'équipe (segmentation de nanoparticule par exemple).

Évolution 3D

L'évolution du modèle pour le traitement de données acquises en trois dimensions a permis de retrouver des résultats similaires couche par couche à ceux que nous avons pu obtenir avec les modèles en deux dimensions. L'utilisation du modèle en trois dimensions apporte néanmoins une composante de corrélation en profondeur et permet ainsi un suivi plus précis dans cette direction.

Les principales améliorations ont été obtenues avec l'utilisation de la déconvolution des images de fluorescence cible rendue possible par ce passage en trois

dimensions sans perdre de signal utile. Pour la prédiction de fluorescence provenant de mitochondries, la quantité d'informations utiles contenues dans les interférogrammes permet même de n'utiliser que l'élément d'intensité ou celui de phase seuls lors des entraînements pour obtenir des résultats de prédiction similaires à ceux du modèle complexe. Cette capacité de reconstruction peut s'expliquer par l'échange d'informations entre phase et intensité au fur et à mesure de la défocalisation. Ainsi, l'ensemble des informations du signal de phase en profondeur est contenu dans le signal d'intensité en volume, réparti sur d'autres couches. L'utilisation de la relation complexe entre ces deux signaux ne semble alors apporter que de la redondance dans le signal qui n'est pas nécessaire pour des éléments visibles à l'oeil nu tels que les mitochondries.

La reconstruction du réticulum endoplasmique, en revanche, présente encore une limitation à des basses fréquences. La limitation de résolution, et donc l'impossibilité de visualiser des éléments aussi petits, semblent former un plafond de verre pour la qualité que l'on peut attendre en termes de prédictions. Dans le cas particulier de ces éléments diffus, il est cependant important de noter que l'utilisation des données complexes du champ électromagnétique permet d'obtenir des modèles bien plus précis que ceux entraînés avec les composantes d'intensité ou de phase seules. La complémentarité des informations semble donc apporter une réelle plus-value pour ce type d'études. Il est désormais nécessaire de déterminer la présence réelle ou non de ce "plafond de verre" et également de déterminer avec nos collaborateurs si les résultats actuels peuvent cependant être exploitables.

Propagation numérique

L'un des principaux moteurs au développement de nos outils est l'étude de la dynamique des éléments intra-cellulaires. Pour réaliser ces études dans les meilleures conditions, nous avons fait en sorte de proposer des méthodes computationnelles permettant d'obtenir des analyses de ces éléments en trois dimensions à partir d'images de microscopie quantitative de phase en deux dimensions. L'utilisation de la microscopie de phase n'étant pas invasive, on peut ainsi réaliser les acquisitions à haute fréquence sur de longues durées.

Afin de valider la pertinence de nos développements nous avons donc réalisé des acquisitions d'images temporelles sur lesquelles nous avons effectué les calculs de propagation suivis d'un passage dans nos algorithmes d'apprentissage profond entraînés pour la prédiction de fluorescence émise par les mitochondries ou par le réticulum endoplasmique.

Ces données ont été acquises comme l'ensemble des autres données présentées dans ce manuscrit dans le but de valider le développement de nos techniques et ne présentent donc pas un intérêt direct en terme d'analyse biologique. De fait, les cellules étudiées, même en imagerie temporelle, étaient marquées et la fréquence d'acquisition n'était pas la plus rapide possible.

Les résultats de ces calculs sont visibles dans la figure 5.2. On voit clairement une qualité de reconstruction des mitochondries dans l'espace très bonne, que

ce soit dans les zones externes de la cellule ou proches du noyau. L'étude temporelle donne ainsi accès aux évolutions des mitochondries que ce soit dans leur déplacement ou leur morphologie.

Ces résultats sont préliminaires et forment juste une preuve de concept d'une potentielle application de notre outil d'apprentissage couplé aux capacités de propagation numérique. Il est également possible de réaliser le même type d'opérations pour la prédiction de réticulum endoplasmique et d'appliquer ces prédictions sur une seule et même cellule. Nous avons fait le choix de ne pas représenter les résultats de prédictions de réticulum endoplasmique en 3D dans le temps à partir d'images de phase en 2D propagées pour des raisons de lisibilité. Pour des éléments aussi diffus et denses, une étude couche par couche semble plus adaptée.

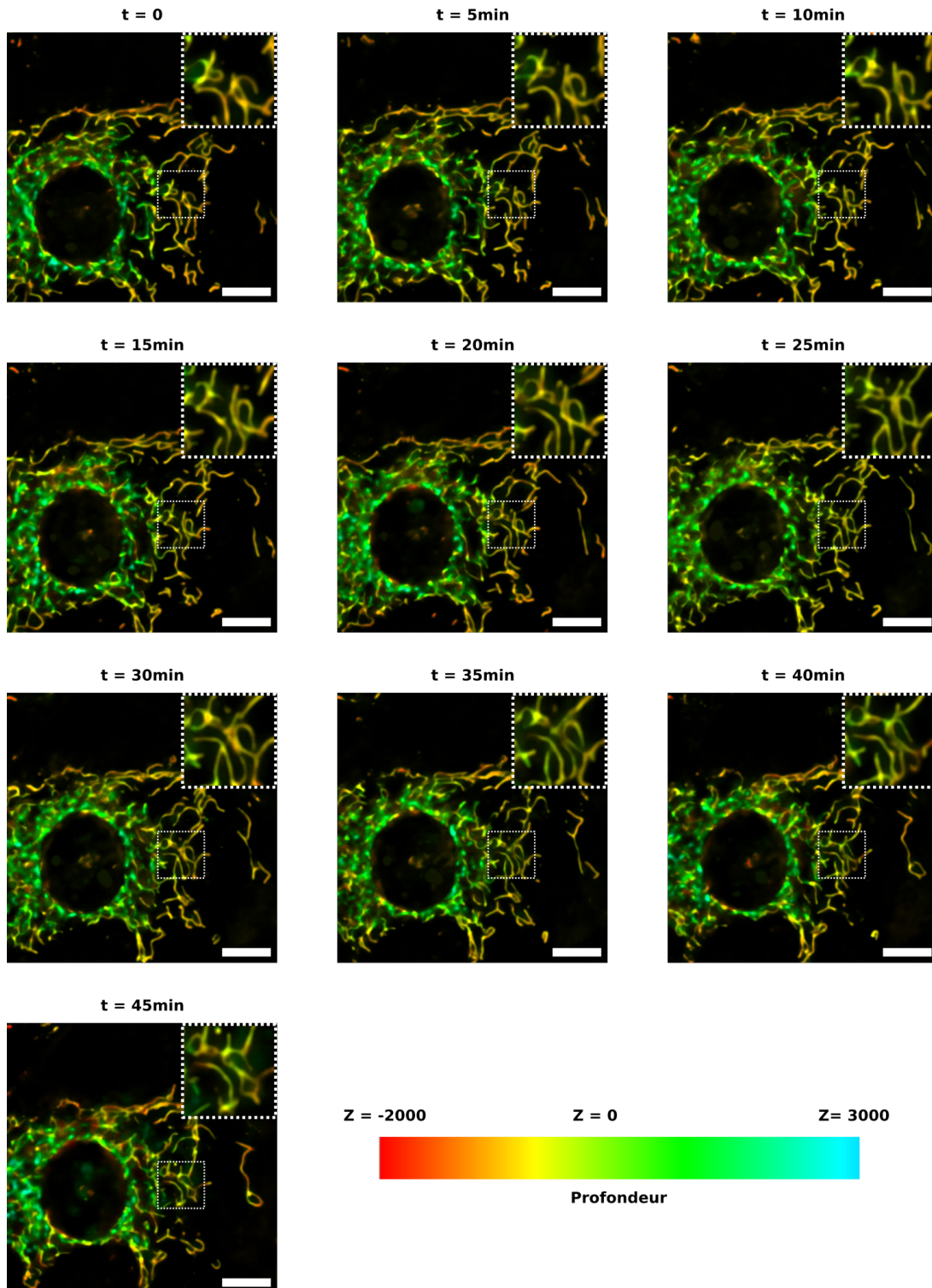


FIGURE 5.2 – Résultats de prédiction de mitochondries en 3D à partir d'une pile venant d'une acquisition 2D en $Z=0$ propagée. Images extraites d'une acquisition temporelle de 48 minutes avec une période de 30 secondes. Échelle : $10\mu\text{m}$.

5.1.3 Analyse critique

Les résultats obtenus sont très encourageants d'un point de vue de la technologie, la possibilité de passer d'une acquisition en deux dimensions à une visualisation de fluorescence en trois dimension pour certains éléments biologiques spécifiques présente des possibilités d'applications très nombreuses. Néanmoins, les travaux présentés dans ce manuscrit couvrent uniquement une preuve de concept de ces technologies et demandent encore de nombreux développements pour améliorer, optimiser et mettre en pratique cet outil.

Cette thèse a posé les fondations d'un axe de recherche dans l'équipe, avec l'acquisition de compétences et d'une expertise dans les applications d'algorithmes d'apprentissage profond pour nos techniques de microscopie. La suite de ces développements est d'ores et déjà assurée avec les résultats du stage de Master 2 de Peter Bonnaud et sa poursuite en thèse sur ces thématiques. De plus, la collaboration avec le groupe d'Arnaud Mourier pour les problématiques de dynamiques mitochondriales n'en est qu'à son commencement et de nombreuses applications vont voir le jour dans les prochaines années.

De nombreux tests et développements ont été réalisés et ne sont pas présentés dans ce manuscrit car ils n'apportaient que très peu d'amélioration ou étaient triviaux à mettre en place. Citons entre autre des essais d'augmentation des données, que ce soit à l'aide de techniques classiques ou par le biais de déformation. Des développements sur la sélection des patches d'entraînement au sein du jeu de données ont aussi été réalisés afin d'obtenir une probabilité quasi-égale pour l'ensemble des pixels de l'image de départ de se retrouver dans un patch (y compris les pixels de bord) et ainsi de permettre une meilleure représentativité des différents cas de figure au sein des images et éviter d'avoir à recourir à une sélection et un centrage attentif lors de l'acquisition expérimentale.

Les tailles de nos jeux de données, et *a fortiori* les tailles des images de qualité suffisantes pour être correctement exploitées étant relativement réduites, il sera nécessaire de passer par une étape de validation à plus grande échelle en parallèle de la mise en pratique sur des projets biologiques concrets. Les tailles de jeux de données actuelles étaient certes suffisantes pour réaliser le gros du développement de la technologie, mais devront être plus importantes au moment de l'étape de validation avant utilisation pour des projets concrets.

5.2 Perspectives

Nous avons réalisé au cours de cette thèse la conception et le développement d'algorithmes d'apprentissage profond et de traitement des données d'imagerie de phase. Pour faire un parallèle avec les processus industriels, nous avons réalisé la phase de développement et sommes en cours de validation. Il restera ensuite à déployer notre solution sur des applications concrètes. Dans ce cadre, il reste des améliorations à apporter à nos outils, que ce soit du point de vue de l'optimisation ou de l'implémentation de nouvelles fonctionnalités.

Je décrirai dans cette partie les améliorations en cours ou prévues sur nos architectures et programmes d'analyse ainsi que les applications concrètes que nous envisageons à court et moyen terme.

5.2.1 Évolutions techniques

Nous avons plusieurs évolutions techniques en cours de développement ou prévues pour améliorer divers aspects de nos modèles. Certaines ont été envisagées et n'ont pas encore été développées faute de temps, d'autres ont été démarrées mais nécessitent un travail plus abouti pour présenter des résultats. Les points suivants sont les pistes principales que nous suivons, cette liste n'est pas exhaustive.

Développement

Les développements que nous avons réalisés pour notre algorithme d'apprentissage profond ont été réalisés dans une démarche d'essais et d'erreurs. Ainsi, bien que les versions fonctionnelles ont été correctement robustifiées une fois validées, de nombreuses améliorations sont encore envisageables que ce soit dans le coeur du code ou dans les évolutions de nouvelles fonctionnalités.

J'ai commencé à développer les fonctions de prise en charge des données complexes il y a trois ans, et à l'époque les nombres complexes n'étaient pas un type de données pris en compte par la librairie Pytorch. Nous avons donc une gestion des composantes réelles et imaginaires séparées avec re-combinaison pour les opérations complexes, mais ces deux composantes sont traitées comme des données de type réel. Maintenant que le type de données complexe est mis en place au sein de la librairie, son utilisation est de plus en plus fréquente au sein de la communauté. Une mise à niveau de mon code utilisant ce nouveau type de données sera donc nécessaire à terme avec une possible participation au développement de la librairie en ce qui concerne les blocs de calcul complexes.

J'ai également été amené à développer une métrique d'apprentissage sur mesure basée sur le coefficient de corrélation de Pearson. Cette métrique pourrait à terme être intégrée au sein de la librairie Pytorch. Nous avons entamé le développement d'une autre métrique d'apprentissage, qui ne calculerait plus la corrélation globale pour déterminer l'erreur, mais utiliserait une corrélation glissante de patches de taille variable. En effet, la corrélation de Pearson a plus

de sens au niveau local et un intérêt variant en fonction de l'échelle à laquelle on la calcule. Ces développements nécessitent donc du temps d'étude et de détermination des calculs optimaux à effectuer théoriquement ainsi que des tests de mise en place et d'applications.

Variations d'architectures

Une des perspectives d'améliorations de nos outils consiste à essayer d'autres types d'architectures basées sur le U-Net. Des variations autour de cette architecture sont présentées très régulièrement pour répondre à des besoins spécifiques. Nous avons essayé d'implémenter des réseaux de type M-Net ou encore d'introduire des blocs résiduels. Ces développements n'ont pour le moment pas produit d'amélioration significative, mais ces recherches seront poursuivies au cours de la thèse de la personne prenant ma suite au sein de l'équipe.

Une des évolutions lourdes que nous avons envisagée est d'utiliser les données dans le domaine de Fourier, obtenues avant reconstitution des deux composantes d'intensité et de phase (Chapitre 3.1.2). Cette évolution nécessiterait un passage de l'ensemble des composantes de nos algorithmes dans le domaine de Fourier. Si certaines fonctions, comme la convolution, ont une équivalence bien connue et facile dans le domaine de Fourier, certaines autres ne sont pas triviales. Il serait également nécessaire de repenser l'architecture complète du U-Net, qui n'est plus nécessairement adaptée dans cet espace. Cette évolution est très excitante et stimulante intellectuellement d'un point de vue de physicien, mais n'est pour l'instant qu'à l'étape de concept dans notre équipe.

Approche 3D couche par couche

Une des approches que nous étudions actuellement pour la prédiction volumique depuis une acquisition en 2D repose sur l'entraînement de modèles prédictifs en deux dimensions pour chaque couche de profondeur sur des données d'entrée propagées et ensuite venir réaliser une prédiction de fluorescence en deux dimensions sur chaque couche de la pile et de les assembler pour reconstruire la pile complète (Figure 5.3.b).

Nous avons commencé à implémenter cette technique mais n'avons pas encore de résultats. Nous sommes convaincus que l'utilisation de la 3D avec une approche couche par couche devrait produire de moins bons résultats que les modèles d'apprentissage 3D, mais la question est de savoir à quel point, et si l'utilisation de cette méthode couche par couche est suffisante pour obtenir des résultats exploitables. En effet, l'utilisation de modèles 2D requiert beaucoup moins de ressources de calcul et est plus rapide que pour un modèle 3D. Dans une optique de déploiement de la solution en externe, tant pour la simplicité à se procurer le matériel de calcul, son coût initial et à l'exploitation que pour la potentialité d'évolution sur des images plus grosses, ces considérations sont importantes.

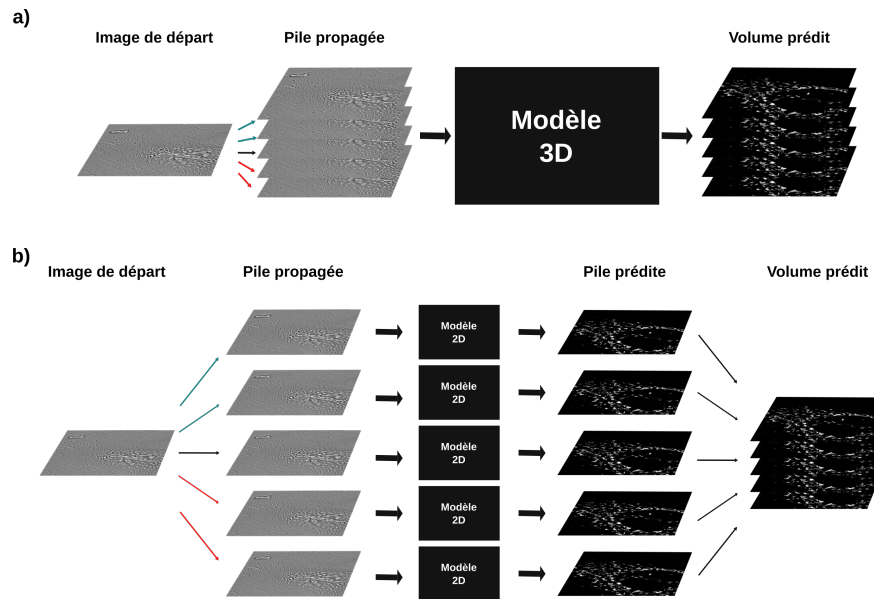


FIGURE 5.3 – Techniques employées pour la prédiction de fluorescence à partir d’une pile d’images propagées. Pour des raisons de lisibilité, seuls la composante d’intensité et cinq couches de profondeur de pile sont représentées. (a) A partir d’une image 2D de départ, on réalise une propagation positive (flèches vertes) et négative (flèches rouges) pour reconstruire une pile 3D. On passe ensuite dans un modèle prédictif 3D pour obtenir la pile prédite. (b) On réalise la propagation de la même manière que pour (a). Chaque image passe alors dans un modèle 2D entraîné pour cette profondeur. Les prédictions en 2D sont ensuite recombinaées pour former le volume prédit.

Interface graphique

Dans l’objectif d’une utilisation de nos modèles entraînés par des biologistes, par exemple pendant l’étape d’imagerie afin de mettre en lumière différents éléments, il sera nécessaire de développer une interface graphique permettant d’avoir facilement accès à des modèles pré-entraînés permettant une prédiction de fluorescence en direct. Les processus d’entraînements et de prédiction étant pour le moment accessibles uniquement par lancement de scripts en ligne de commande (ceci dans l’objectif de pouvoir facilement être déployés sur des serveurs de calculs externes), une évolution et l’introduction d’une interface graphique permettant d’utiliser uniquement des boutons sera nécessaire pour un usage par d’autres personnes que les développeurs du projet.

5.2.2 Applications

Le principal intérêt de développer un tel outil est d'avoir une utilité pour des problématiques biologiques concrètes. Les premières applications auraient du voir le jour au cours de l'année passée mais ont malheureusement du être repoussées. Nos algorithmes et processus de calcul étant désormais robustes, nous pouvons envisager certaines applications concrètes.

Analyse morphologique

La qualité de reconstruction de fluorescence que nous avons obtenu pour les mitochondries peut permettre des études morphologiques des mitochondries ainsi que leur dynamique. A partir des reconstructions de fluorescence, il est facile d'extraire uniquement les différentes mitochondries et d'utiliser des outils d'analyse pour les segmenter, les suivre au cours du temps, étudier leur formes et orientations, ainsi que les changements d'états.

Cet outil ouvre également la possibilité d'étudier plus en détail les interactions entre différentes mitochondries, notamment des phénomènes de *kiss and run*. Comme nous avons en parallèle les composantes de phase et d'intensité, nous avons également accès aux informations sur les éléments très visibles de la cellule tels que le noyau ou la membrane et ainsi étudier les positions et déplacements de mitochondries vis-à-vis de ces éléments.

Nous avons également réalisé quelques tests sur des cellules avec injection d'inhibiteurs tels que le CCCP afin d'observer l'impact sur le comportement des éléments intra-cellulaires. Ces essais sont restés au stade de tests préliminaires et de nouvelles acquisitions sont nécessaires afin de fournir des données exploitables et fiables.

État d'oxydation

Les mitochondries réagissent différemment en fonction de leur état d'oxydation, et donc d'activation. Il en résulte des variations d'indice de réfraction et donc de différences de chemin optique auxquelles notre technique d'imagerie est sensible. Il est donc possible que nos modèles soient capable de détecter l'état d'oxydation si on les entraîne à ne reconnaître que les mitochondries dans un certain état. Ce type d'entraînement nécessite cependant un grand nombre de données avec une fluorescence précise pour un seul des deux états. Il est à ma connaissance possible de forcer le passage dans un état particulier de toutes les mitochondries d'une cellule, ce qui pourrait permettre d'avoir des données pour un des cas de figure. L'optimal pour nos entraînements serait d'avoir des cellules contenant des mitochondries dans les différents états avec un marquage correspondant (uniquement les mitochondries à l'état oxydé émettent de la fluorescence) afin que le modèle puisse arriver à détecter des différences entre deux éléments très similaires mais dans des états différents.

Autres organelles

Nous avons montré que nos modèles étaient très performants pour les éléments relativement visibles à l'oeil nu sur nos données de phase (les mitochondries) et présentaient des limitations pour les éléments plus fins ou diffus (réticulum endoplasmique). Il est bien évidemment possible d'appliquer notre technologie à d'autres organelles, à partir du moment où elles peuvent produire de la fluorescence afin d'obtenir la cible des entraînements. Les résultats devraient être sensiblement similaires à ceux que nous avons déjà obtenus dépendamment du type d'élément à observer, visible ou diffus.

Ouverture globale

Nous avons réalisé des développements qui avaient du sens d'un point de vue physique et qui ont produit des résultats de bonne qualité. L'étape suivante consiste en un développement en lien direct avec nos collaborateurs afin qu'ils puissent orienter nos recherches dans les directions les plus utiles pour eux. Une étape d'optimisation des calculs et de l'interface sera également nécessaire afin de pouvoir permettre une utilisation confortable par les expérimentateurs. Les bases de cette technique étant désormais posées, je suis convaincu de son utilité à venir pour des applications directes sur des sujets biologiques et plus généralement pour des évolutions dans la façon d'utiliser les images de microscopie de phase.

L'amélioration constante des capacités d'imagerie de phase permettra à terme d'envisager le déploiement de mon travail dans le cadre d'une imagerie tissulaire. Cela ouvrira alors la voie à des études biologiques sur échantillons bien plus complexes.

Bibliographie

- ABBE, E (1874). « A contribution to the theory of the microscope and the nature of microscopic vision. » In : *Proc. Bristol Nat. Soc.* 1.1, p. 200-261.
- ALOWAMI, Salem, Sandra TROUP, Sahar AL-HADDAD, Iain KIRKPATRICK et Peter H WATSON (2003). « Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression ». In : *Breast Cancer Research : BCR* 5.5, R129-R135.
- ARJOVSKY, Martin, Amar SHAH et Yoshua BENGIO (11 juin 2016). « Unitary Evolution Recurrent Neural Networks ». In : *Proceedings of The 33rd International Conference on Machine Learning*. International Conference on Machine Learning. ISSN : 1938-7228. PMLR, p. 1120-1128.
- BALDI, Pierre et Søren BRUNAK (20 juill. 2001). *Bioinformatics, second edition : The Machine Learning Approach*. Google-Books-ID : pxSM7R1sdeQC. MIT Press. 492 p.
- BARTY, A., K. A. NUGENT, D. PAGANIN et A. ROBERTS (1^{er} juin 1998). « Quantitative optical phase microscopy ». In : *Optics Letters* 23.11. Publisher : Optica Publishing Group, p. 817-819.
- BETZIG, Eric et al. (15 sept. 2006). « Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution ». In : *Science* 313.5793. Publisher : American Association for the Advancement of Science, p. 1642-1645.
- BINNIG, G., C. F. QUATE et Ch. GERBER (3 mars 1986). « Atomic Force Microscope ». In : *Physical Review Letters* 56.9. Publisher : American Physical Society, p. 930-933.
- BON, Pierre, Sherazade AKNOUN, Serge MONNERET et Benoit WATTELLIER (7 avr. 2014). « Enhanced 3D spatial resolution in quantitative phase microscopy using spatially incoherent illumination ». In : *Optics Express* 22.7. Publisher : Optica Publishing Group, p. 8654-8671.
- BON, Pierre, Nicolas BOURG et al. (27 juill. 2015). « Three-dimensional nanometre localization of nanoparticles to enhance super-resolution microscopy ». In : *Nature Communications* 6.1. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 7764.
- BON, Pierre, Guillaume MAUCORT, Benoit WATTELLIER et Serge MONNERET (20 juill. 2009). « Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells ». In : *Optics Express* 17.15. Publisher : Optica Publishing Group, p. 13080-13094.
- BON, Pierre, Serge MONNERET et Benoit WATTELLIER (10 août 2012). « Non-iterative boundary-artifact-free wavefront reconstruction from its deriva-

- tives ». In : *Applied Optics* 51.23. Publisher : Optica Publishing Group, p. 5698-5704.
- BRAND, Martin D. et David G. NICHOLLS (29 mars 2011). « Assessing mitochondrial dysfunction in cells ». In : *Biochemical Journal* 435.2, p. 297-312.
- BRUNA, Joan et al. (12 déc. 2015). *A mathematical motivation for complex-valued convolutional networks*.
- CAMPAGNOLA, Paul (2001). « Second harmonic imaging microscopy of living cells ». In : *J. of Biomedical Optics*.
- CAO, Yue, Shigang LIU, Yali PENG et Jun LI (2020). « DenseUNet : densely connected UNet for electron microscopy image segmentation ». In : *IET Image Processing* 14.12, p. 2682-2689.
- CARLTON, Robert Allen (2011). « Polarized Light Microscopy ». In : *Pharmaceutical Microscopy*. Sous la dir. de Robert Allen CARLTON. New York, NY : Springer, p. 7-64.
- CAVALIER-SMITH, T. (déc. 1986). « The kingdoms of organisms ». In : *Nature* 324.6096. Number : 6096 Publisher : Nature Publishing Group, p. 416-417.
- CHALFIE, Martin (23 juin 2009). « GFP : Lighting up life ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.25. Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 10073-10080.
- CHELLAPILLA, K. et D.B. FOGEL (nov. 1999). « Evolving neural networks to play checkers without relying on expert knowledge ». In : *IEEE Transactions on Neural Networks* 10.6. Conference Name : IEEE Transactions on Neural Networks, p. 1382-1391.
- CHEN, Yixin, J.Z. WANG et R. KROVETZ (août 2005). « CLUE : cluster-based retrieval of images by unsupervised learning ». In : *IEEE Transactions on Image Processing* 14.8. Conference Name : IEEE Transactions on Image Processing, p. 1187-1201.
- CHRISTIANSEN, Eric M. et al. (19 avr. 2018). « In silico labeling : Predicting fluorescent labels in unlabeled images ». In : *Cell* 173.3, 792-803.e19.
- CHU, Jun et al. (mai 2014). « Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein ». In : *Nature methods* 11.5, p. 572-578.
- CIREŞAN, Dan, Ueli MEIER et Juergen SCHMIDHUBER (13 fév. 2012). « Multi-column Deep Neural Networks for Image Classification ». In : *arXiv :1202.2745 [cs]*.
- CLARK, Christopher et Amos STORKEY (27 jan. 2015). *Teaching Deep Convolutional Neural Networks to Play Go*.
- CLINE, Harvey E. et al. (déc. 1992). « MR-Guided Focused Ultrasound Surgery ». In : *Journal of Computer Assisted Tomography* 16.6, p. 956-965.
- COLLOBERT, Ronan et al. (2 mars 2011). *Natural Language Processing (almost) from Scratch*.
- CREATH, Katherine (1^{er} jan. 1988). « V Phase-Measurement Interferometry Techniques ». In : *Progress in Optics*. Sous la dir. d'E. WOLF. T. 26. Elsevier, p. 349-393.
- CUCHE, Etienne, Pierre MARQUET et Christian DEPEURSINGE (1^{er} déc. 1999). « Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast micro-

- scopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms ». In : *Applied Optics* 38.34. Publisher : Optica Publishing Group, p. 6994-7001.
- DADDYSMAN, Matthew K., Michael A. TYCON et Christopher J. FECKO (2014). « Photoinduced Damage Resulting from Fluorescence Imaging of Live Cells ». In : *Photoswitching Proteins : Methods and Protocols*. Sous la dir. de Sidney CAMBRIDGE. Methods in Molecular Biology. New York, NY : Springer, p. 1-17.
- DAHOUT-GONZALEZ, C. et al. (août 2006). « Molecular, Functional, and Pathological Aspects of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier ». In : *Physiology* 21.4. Publisher : American Physiological Society, p. 242-249.
- DAVIDOVITS, Paul et M. David EGGER (août 1969). « Scanning Laser Microscope ». In : *Nature* 223.5208. Number : 5208 Publisher : Nature Publishing Group, p. 831-831.
- DENG, Xiangying et al. (11 déc. 2018). « Application of atomic force microscopy in cancer research ». In : *Journal of Nanobiotechnology* 16.1, p. 102.
- DENIS DE SENNEVILLE, B., B. QUESSON et C. T. W. MOONEN (1^{er} sept. 2005). « Magnetic resonance temperature imaging ». In : *International Journal of Hyperthermia* 21.6. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/02656730500133785>, p. 515-531.
- DENK, Winifried, James H. STRICKLER et Watt W. WEBB (6 avr. 1990). « Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy ». In : *Science* 248.4951. Publisher : American Association for the Advancement of Science, p. 73-76.
- DICE, Lee R. (1945). « Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species ». In : *Ecology* 26.3. Publisher : Ecological Society of America, p. 297-302.
- DIN, Nizam Ud et Ji YU (18 mai 2021). *Unsupervised deep learning method for cell segmentation*. Pages : 2021.05.17.444529 Section : New Results.
- ERNI, Rolf P. (22 juill. 2009). « Atomic Resolution Imaging with a sub-50 pm Electron Probe ». In.
- FAWAKHERJI, Mulham, Ali YOUSSEF, Domenico BLOISI, Alberto PRETTO et Daniele NARDI (fév. 2019). « Crop and Weeds Classification for Precision Agriculture Using Context-Independent Pixel-Wise Segmentation ». In : *2019 Third IEEE International Conference on Robotic Computing (IRC)*. 2019 Third IEEE International Conference on Robotic Computing (IRC), p. 146-152.
- FLORIAN, Paula Ecaterina, Yves ROUILLÉ, Simona RUTA, Norica NICHITA et Anca ROSEANU (2016). « Recent advances in human viruses imaging studies ». In : *Journal of Basic Microbiology* 56.6. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jobm.201500575>, p. 591-607.
- GABOR, D (1^{er} mai 1948). « A new microscopic principle ». In : *Nature* 161.4098, p. 777.
- GERMAIN, Marc, Jaigi P MATHAI, Heidi M MCBRIDE et Gordon C SHORE (20 avr. 2005). « Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis ». In : *The EMBO Journal* 24.8, p. 1546-1556.

- GHOSH, Jonathan et al. (1^{er} jan. 2006). « Reduction of myointimal hyperplasia after arterial anastomosis by local injection of transforming growth factor $\beta 3$ ». In : *Journal of Vascular Surgery* 43.1, p. 142-149.
- GRANTER, Scott R., Andrew H. BECK et David J. PAPKE Jr (1^{er} mai 2017). « AlphaGo, Deep Learning, and the Future of the Human Microscopist ». In : *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 141.5, p. 619-621.
- GRINVALD, Amiram, Edmund LIEKE, Ron D. FROSTIG, Charles D. GILBERT et Torsten N. WIESEL (nov. 1986). « Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals ». In : *Nature* 324.6095. Number : 6095 Publisher : Nature Publishing Group, p. 361-364.
- GUBERMAN, Nitzan (29 fév. 2016). *On Complex Valued Convolutional Neural Networks*. arXiv :1602.09046. type : article. arXiv.
- GUERRA, John M. (26 juin 1995). « Super-resolution through illumination by diffraction-born evanescent waves ». In : *Applied Physics Letters* 66.26. Publisher : American Institute of Physics, p. 3555-3557.
- GUSTAFSSON, M. G. L. (2000). « Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy ». In : *Journal of Microscopy* 198.2. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>, p. 82-87.
- HAMON, Loic, Patrick A. CURMI et David PASTRÉ (2010). « High-resolution imaging of microtubules and cytoskeleton structures by atomic force microscopy ». In : *Methods in Cell Biology* 95, p. 157-174.
- HARTUNG, Michael P., Thomas M. GRIST et Christopher J. FRANÇOIS (9 mars 2011). « Magnetic resonance angiography : current status and future directions ». In : *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 13.1, p. 19.
- HAYASHI, Teruo, Rosario RIZZUTO, Gyorgy HAJNOCZKY et Tsung-Ping SU (fév. 2009). « MAM : more than just a housekeeper ». In : *Trends in Cell Biology* 19.2, p. 81-88.
- HELL, S. W. et J. WICHMANN (1^{er} juin 1994). « Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy ». In : *Optics Letters* 19.11, p. 780-782.
- HESS, Samuel T., Thanu P. K. GIRIRAJAN et Michael D. MASON (1^{er} déc. 2006). « Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy ». In : *Biophysical Journal* 91.11. Publisher : Elsevier, p. 4258-4272.
- HINTON, Geoffrey et Terrence J. SEJNOWSKI (24 mai 1999). *Unsupervised Learning : Foundations of Neural Computation*. Google-Books-ID : yj04Y0lje4cC. MIT Press. 420 p.
- HORIO, Tetsuya et Hirokazu HOTANI (juin 1986). « Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy ». In : *Nature* 321.6070. Number : 6070 Publisher : Nature Publishing Group, p. 605-607.
- HORTON, Nicholas G. et al. (1^{er} mars 2013). « In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain ». In : *Nature photonics* 7.3, p. 205-209.

- HUANG, Lei, Dawei YANG, Bo LANG et Jia DENG (23 avr. 2018). *Decorrelated Batch Normalization*. arXiv :1804.08450. type : article. arXiv.
- INGLIS, Tiffany et al. (2010). « Multilevel Space-Time Aggregation for Bright Field Cell Microscopy Segmentation and Tracking ». In : *International Journal of Biomedical Imaging* 2010, p. 582760.
- IOFFE, Sergey et Christian SZEGEDY (2 mars 2015). « Batch Normalization : Accelerating Deep Network Training by Reducing Internal Covariate Shift ». In : *arXiv :1502.03167 [cs]*.
- ISOLA, Phillip, Jun-Yan ZHU, Tinghui ZHOU et Alexei A. EFROS (juill. 2017). « Image-to-Image Translation with Conditional Adversarial Networks ». In : *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. 2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). Honolulu, HI : IEEE, p. 5967-5976.
- JACCARD, Paul (1912). « The Distribution of the Flora in the Alpine Zone.1 ». In : *New Phytologist* 11.2. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>, p. 37-50.
- KAWAMURA, Akiyoshi (1983). *Immunofluorescence in medical science : with 28 tab.* OCLC : 643714056. Berlin u.a. : Springer u.a.
- KERR, Jason N. D. et Winfried DENK (mars 2008). « Imaging in vivo : watching the brain in action ». In : *Nature Reviews Neuroscience* 9.3. Number : 3 Publisher : Nature Publishing Group, p. 195-205.
- KINGMA, Diederik P. et Jimmy BA (29 jan. 2017). « Adam : A Method for Stochastic Optimization ». In : *arXiv :1412.6980 [cs]*.
- KRIZHEVSKY, Alex, Ilya SUTSKEVER et Geoffrey E HINTON (2012). « ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks ». In : *Advances in Neural Information Processing Systems*. T. 25. Curran Associates, Inc.
- KU, Geng et al. (oct. 2005). « Thermoacoustic and photoacoustic tomography of thick biological tissues toward breast imaging ». In : *Technology in Cancer Research & Treatment* 4.5, p. 559-566.
- KUMAR, Vivek, Denis KALITIN et Prayag TIWARI (mai 2017). « Unsupervised learning dimensionality reduction algorithm PCA for face recognition ». In : *2017 International Conference on Computing, Communication and Automation (ICCCA)*, p. 32-37.
- LAUTERBUR, P. C. (mars 1973). « Image Formation by Induced Local Interactions : Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance ». In : *Nature* 242.5394. Number : 5394 Publisher : Nature Publishing Group, p. 190-191.
- LECUN, Yann, Yoshua BENGIO et T Bell LABORATORIES (1995). « Convolutional Networks for Images, Speech, and Time-Series ». In : p. 14.
- LEGROS, Frédéric, Florence MALKA, Paule FRACHON, Anne LOMBÈS et Manuel ROJO (1^{er} juin 2004). « Organization and dynamics of human mitochondrial DNA ». In : *Journal of Cell Science* 117.13, p. 2653-2662.
- LILICRAP, Timothy P. et al. (5 juill. 2019). *Continuous control with deep reinforcement learning*.
- LYSAKOWSKI, A., H. FIGUERAS, S. D. PRICE et Y. Y. PENG (18 jan. 1999). « Dense-cored vesicles, smooth endoplasmic reticulum, and mitochondria are

- closely associated with non-specialized parts of plasma membrane of nerve terminals : implications for exocytosis and calcium buffering by intraterminal organelles ». In : *The Journal of Comparative Neurology* 403.3, p. 378-390.
- MAZZARELLO, Paolo (mai 1999). « A unifying concept : the history of cell theory ». In : *Nature Cell Biology* 1.1. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- MCBRIDE, Heidi M., Margaret NEUSPIEL et Sylwia WASIAK (25 juill. 2006). « Mitochondria : More Than Just a Powerhouse ». In : *Current Biology* 16.14. Publisher : Elsevier, R551-R560.
- MCCULLOCH, Warren S. et Walter PITTS (1^{er} déc. 1943). « A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity ». In : *The bulletin of mathematical biophysics* 5.4, p. 115-133.
- MINSKY, Marvin (1967). « Microscopy apparatus ». Brev. amér. 3013467.
- MITCHELL, Peter (juill. 1961). « Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism ». In : *Nature* 191.4784, p. 144-148.
- MNIH, Volodymyr et al. (fév. 2015). « Human-level control through deep reinforcement learning ». In : *Nature* 518.7540. Number : 7540 Publisher : Nature Publishing Group, p. 529-533.
- MOEN, Erick et al. (déc. 2019). « Deep learning for cellular image analysis ». In : *Nature Methods* 16.12. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 12 Primary_atype : Reviews Publisher : Nature Publishing Group Subject_term : Image processing ; Software Subject_term_id : image-processing ; software, p. 1233-1246.
- MONTALT-TORDERA, Javier, Vivek MUTHURANGU, Andreas HAUPTMANN et Jennifer Anne STEEDEN (1^{er} mars 2021). « Machine learning in Magnetic Resonance Imaging : Image reconstruction ». In : *Physica Medica* 83, p. 79-87.
- MURUGESAPILLAI, Divakaran et al. (18 août 2014). « DNA bridging and looping by HMO1 provides a mechanism for stabilizing nucleosome-free chromatin ». In : *Nucleic Acids Research* 42.14, p. 8996-9004.
- NOMARSKI, G. et WEILL, A. R. (1955). « Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées ». In : *Rev. Met. Paris* 52.2, p. 121-134.
- NOVIKOV, Alexey A. et al. (13 fév. 2018). *Fully Convolutional Architectures for Multi-Class Segmentation in Chest Radiographs*.
- OUNKOMOL, Chawin, Sharmishta SESHAMANI, Mary M. MALECKAR, Forrest COLLMAN et Gregory R. JOHNSON (nov. 2018). « Label-free prediction of three-dimensional fluorescence images from transmitted-light microscopy ». In : *Nature Methods* 15.11, p. 917-920.
- PADDOCK, Stephen W. (1^{er} oct. 2000). « Principles and practices of laser scanning confocal microscopy ». In : *Molecular Biotechnology* 16.2, p. 127-149.
- PALADE, George E. (25 juill. 1956). « THE ENDOPLASMIC RETICULUM ». In : *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2.4, p. 85-98.
- PETERSEN, Steffen E. et al. (3 fév. 2017). « Reference ranges for cardiac structure and function using cardiovascular magnetic resonance (CMR) in Cau-

- casians from the UK Biobank population cohort ». In : *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 19.1, p. 18.
- PRAVITASARI, Anindya Apriyanti et al. (1^{er} juin 2020). « UNet-VGG16 with transfer learning for MRI-based brain tumor segmentation ». In : *TELKOMNIKA (Telecommunication Computing Electronics and Control)* 18.3. Number : 3, p. 1310-1318.
- PRIMOT, Jérôme (1^{er} juill. 2003). « Theoretical description of Shack–Hartmann wave-front sensor ». In : *Optics Communications* 222.1, p. 81-92.
- PRIMOT, Jérôme et Nicolas GUÉRINEAU (1^{er} nov. 2000). « Extended Hartmann test based on the pseudoguiding property of a Hartmann mask completed by a phase chessboard ». In : *Applied Optics* 39.31. Publisher : Optica Publishing Group, p. 5715-5720.
- REDMON, Joseph, Santosh DIVVALA, Ross GIRSHICK et Ali FARHADI (juin 2016). « You Only Look Once : Unified, Real-Time Object Detection ». In : *2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. ISSN : 1063-6919, p. 779-788.
- RICH, P. R. (déc. 2003). « The molecular machinery of Keilin’s respiratory chain ». In : *Biochemical Society Transactions* 31 (Pt 6), p. 1095-1105.
- RIZZUTO, Rosario, Michael R. DUCHEN et Tullio POZZAN (13 jan. 2004). « Flirting in little space : the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison ». In : *Science’s STKE : signal transduction knowledge environment* 2004.215, re1.
- RONNEBERGER, Olaf, Philipp FISCHER et Thomas BROX (2015). « U-Net : Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation ». In : *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*. Sous la dir. de Nassir NAVAB, Joachim HORNEGGER, William M. WELLS et Alejandro F. FRANGI. Cham : Springer International Publishing, p. 234-241.
- ROSE, Sarah, Sarah WONG et Cecilia GIULIVI (2016). « Mitochondrial DNA Damage in Autism ». In : *Biochemistry of Oxidative Stress*. Publisher : Springer, Cham, p. 327-343.
- ROSENBLATT, F. (1958). « The perceptron : A probabilistic model for information storage and organization in the brain ». In : *Psychological Review* 65.6. Place : US Publisher : American Psychological Association, p. 386-408.
- RUMELHART, David E., Geoffrey E. HINTON et Ronald J. WILLIAMS (oct. 1986). « Learning representations by back-propagating errors ». In : *Nature* 323.6088. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 6088 Primary_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group, p. 533-536.
- RUST, Michael J., Mark BATES et Xiaowei ZHUANG (oct. 2006). « Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution ». In : *Nature methods* 3.10, p. 793-795.
- SABANAY, I., T. ARAD, S. WEINER et B. GEIGER (sept. 1991). « Study of vitrified, unstained frozen tissue sections by cryoimmunoelectron microscopy ». In : *Journal of Cell Science* 100 (Pt 1), p. 227-236.
- SADEK, R. (2013). « Regional Atrophy Analysis of MRI for Early Detection of Alzheimer’s Disease ». In : 6.

- SCHAPIRA, Anthony HV (1^{er} juill. 2006). « Mitochondrial disease ». In : *The Lancet* 368.9529, p. 70-82.
- SCHRADER, M, K. BAHLMANN et S. W. HELL (1997). « Three-Photon-Excitation Microscopy : theory, experiment and applications ». In : *Three-Photon-Excitation Microscopy : theory, experiment and applications* 104.3. Place : Jena Publisher : Elsevier, p. 116-124.
- SENNEVILLE, B. Denis de, Charles MOUGENOT et Chrit T.W. MOONEN (2007). « Real-time adaptive methods for treatment of mobile organs by MRI-controlled high-intensity focused ultrasound ». In : *Magnetic Resonance in Medicine* 57.2. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mrm.21124>, p. 319-330.
- SHANER, Nathan C. et al. (déc. 2004). « Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein ». In : *Nature Biotechnology* 22.12, p. 1567-1572.
- SHELHAMER, Evan, Jonathan LONG et Trevor DARRELL (avr. 2017). « Fully Convolutional Networks for Semantic Segmentation ». In : *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 39.4. Conference Name : IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, p. 640-651.
- SHEN, Dinggang, Guorong WU et Heung-Il SUK (2017). « Deep Learning in Medical Image Analysis ». In : *Annual Review of Biomedical Engineering* 19.1. _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044442>, p. 221-248.
- SHEPP, L. A. et Y. VARDI (oct. 1982). « Maximum Likelihood Reconstruction for Emission Tomography ». In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 1.2. Conference Name : IEEE Transactions on Medical Imaging, p. 113-122.
- SINGH, Harpreet et al. (mars 2012). « Visualization and Quantification of Cardiac Mitochondrial Protein Clusters with STED Microscopy ». In : *Mitochondrion* 12.2, p. 230-236.
- SNYMAN, Jan (2005). *Practical Mathematical Optimization*.
- SONG, Youyi, Teng ZHOU, Jeremy Yuen-Chun TEOH, Jing ZHANG et Jing QIN (2020). « Unsupervised Learning for CT Image Segmentation via Adversarial Redrawing ». In : *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2020*. Sous la dir. d'Anne L. MARTEL et al. Lecture Notes in Computer Science. Cham : Springer International Publishing, p. 309-320.
- SORRELL, J. Michael et Arnold I. CAPLAN (2009). « Chapter 4 Fibroblasts—A Diverse Population at the Center of It All ». In : *International Review of Cell and Molecular Biology*. T. 276. International Review of Cell and Molecular Biology. Academic Press, p. 161-214.
- TANAAMI, Takeo et al. (1^{er} août 2002). « High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks ». In : *Applied Optics* 41.22. Publisher : Optica Publishing Group, p. 4704-4708.
- TEAGUE, Michael Reed (1^{er} nov. 1985). « Image formation in terms of the transport equation ». In : *JOSA A* 2.11. Publisher : Optica Publishing Group, p. 2019-2026.

- TRABELSI, Chiheb et al. (25 fév. 2018). « Deep Complex Networks ». In : *arXiv :1705.09792 [cs]*. version : 4.
- TZAGOLOFF, Alexander (1982). *Mitochondria*. Open Library ID : OL22233539M. New York, London : Plenum. xiv,342.
- UECKER, Martin et al. (2010). « Real-time MRI at a resolution of 20 ms ». In : *NMR in Biomedicine* 23.8. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/nbm.1585>, p. 986-994.
- WALLACE, Douglas C. (oct. 2012). « Mitochondria and cancer ». In : *Nature Reviews Cancer* 12.10. Number : 10 Publisher : Nature Publishing Group, p. 685-698.
- WALLACH, Izhar, Michael DZAMBA et Abraham HEIFETS (9 oct. 2015). *Atom-Net : A Deep Convolutional Neural Network for Bioactivity Prediction in Structure-based Drug Discovery*.
- WANG, Lihong V. et Song HU (23 mars 2012). « Photoacoustic tomography : in vivo imaging from organelles to organs ». In : *Science (New York, N. Y.)* 335.6075, p. 1458-1462.
- WANG, Xueding et al. (juill. 2003). « Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain ». In : *Nature Biotechnology* 21.7, p. 803-806.
- WANG, Yingxiao, John Y.-J. SHYY et Shu CHIEN (1^{er} août 2008). « Fluorescence Proteins, Live-Cell Imaging, and Mechanobiology : Seeing Is Believing ». In : *Annual Review of Biomedical Engineering* 10.1, p. 1-38.
- WANG, Zhou, A.C. BOVIK, H.R. SHEIKH et E.P. SIMONCELLI (avr. 2004). « Image quality assessment : from error visibility to structural similarity ». In : *IEEE Transactions on Image Processing* 13.4. Conference Name : IEEE Transactions on Image Processing, p. 600-612.
- WESTPHAL, Volker et al. (11 avr. 2008). « Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement ». In : *Science (New York, N. Y.)* 320.5873, p. 246-249.
- WHITTAKER, R. H. et Lynn MARGULIS (1^{er} avr. 1978). « Protist classification and the kingdoms of organisms ». In : *Biosystems* 10.1, p. 3-18.
- WOLMAN, M. et F. H. KASTEN (1^{er} jan. 1986). « Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin ». In : *Histochemistry* 85.1, p. 41-49.
- WOMBACHER, Richard et Virginia CORNISH (2011). « Chemical tags : Applications in live cell fluorescence imaging ». In : *Journal of Biophotonics*, p. 391-402.
- XU, Haijiao et al. (16 avr. 2013). « The Asymmetrical Structure of Golgi Apparatus Membranes Revealed by In situ Atomic Force Microscope ». In : *PLOS ONE* 8.4. Publisher : Public Library of Science, e61596.
- XU, Minghua et Lihong V. WANG (avr. 2006). « Photoacoustic imaging in biomedicine ». In : *Review of Scientific Instruments* 77.4. Publisher : American Institute of Physics, p. 041101.
- ZERNIKE, F. (1^{er} juill. 1942). « Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects ». In : *Physica* 9.7, p. 686-698.

- ZHANG, Zhengxin, Qingjie LIU et Yunhong WANG (mai 2018). « Road Extraction by Deep Residual U-Net ». In : *IEEE Geoscience and Remote Sensing Letters* 15.5, p. 749-753.
- ZHOU, Zhenpeng, Xiaocheng LI et Richard N. ZARE (27 déc. 2017). « Optimizing Chemical Reactions with Deep Reinforcement Learning ». In : *ACS Central Science* 3.12. Publisher : American Chemical Society, p. 1337-1344.