



INSA

N°d'ordre NNT :2021LYSEI057

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'INSA Lyon

Ecole Doctorale 160
Electronique, Electrotechnique et Automatique

Spécialité/ discipline de doctorat :
Traitement du signal et de l'image

Soutenue publiquement le 23/09/2021, par :
Ali AHMAD

**Simulation et apprentissage machine
pour l'analyse d'images de cellules
uniques basée sur la microscopie à
fluorescence en microfluidique**

Devant le jury composé de :

PEYRIN, Françoise
LORENZO, Corinne
ZIMMER, Christophe
WEIGERT, Martin
SARRUT, David
ROUSSEAU, David
FRINDEL, Carole

DR-HDR
IR-HDR
DR-HDR
MCF
DR
PU
MCF- HDR

ESRF-INSA Lyon
Université de Toulouse
Institut Pasteur
EPFL Lausanne
CNRS Lyon
Université d'Angers
INSA Lyon

Examinatrice
Rapporteuse
Rapporteur
Examinateur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Encadrante

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	<u>CHIMIE DE LYON</u> https://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr	M. Stéphane DANIELE C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69616 Villeurbanne directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	<u>ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</u> https://edeea.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Bâtiment Direction INSA Lyon Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr	M. Philippe DELACHARTRE INSA LYON Laboratoire CREATIS Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 philippe.delachartre@insa-lyon.fr
E2M2	<u>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</u> http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	M. Philippe NORMAND Université Claude Bernard Lyon 1 UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX philippe.normand@univ-lyon1.fr
EDISS	<u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ</u> http://ediss.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	Mme Sylvie RICARD-BLUM Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Raulin - 2ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tél : +33(0)4 72 44 82 32 sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	<u>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</u> http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	M. Hamamache KHEDDOUCI Université Claude Bernard Lyon 1 Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tél : 04.72.44.83.69 hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr
Matériaux	<u>MATÉRIAUX DE LYON</u> http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.44 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr	M. Stéphane BENAYOUN Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 avenue Guy de Collongue 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 stephane.benayoun@ec-lyon.fr
MEGA	<u>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u> http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Direction INSA Lyon mega@insa-lyon.fr	M. Jocelyn BONJOUR INSA Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69621 Villeurbanne CEDEX jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr
ScSo	<u>ScSo*</u> https://edsciencessociales.universite-lyon.fr Sec. : Mélina FAVETON INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.77.79 melina.faveton@univ-lyon2.fr	M. Christian MONTES Université Lumière Lyon 2 86 Rue Pasteur 69365 Lyon CEDEX 07 christian.montes@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

À LA MÉMOIRE DE MON PÈRE...

Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de mon père, qui m'a toujours supporté et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de son fils...

À TOUTE MA FAMILLE...

En informatique, la
miniaturisation augmente la
puissance de calcul. On peut être
plus petit et plus intelligent.

Bernard Werber

S'il n'y avait pas la Science,
combien d'entre nous pourraient
profiter de leur cancer pendant
plus de cinq ans?

Pierre Desproges

SIMULATION ET APPRENTISSAGE MACHINE POUR L'ANALYSE D'IMAGES DE CELLULES UNIQUES BASÉE SUR LA MICROSCOPIE À FLUORESCENCE EN MICROFLUIDIQUE**Résumé**

Cette thèse se situe dans le contexte de l'étude des cellules isolées, i.e. la cytologie. Cette branche de l'analyse du vivant est en pleine évolution grâce à des apports technologiques révolutionnaires. Ainsi, grâce à la microfluidique, les cellules peuvent désormais être amenées automatiquement sous un microscope là où elles étaient classiquement triées selon des signatures spectrométriques mono-dimensionnelles. Par ailleurs, grâce aux études sur les organoïdes et la transparençation des tissus il est possible d'observer in situ et de façon faiblement invasive la forme et les textures individuelles des cellules dans des agrégats en trois dimensions. La puissance de ces évolutions technologiques en cytologie est possiblement décuplée quand elles sont associées à la diversité des modalités de microscopies à fluorescence ou encore à l'intelligence artificielle par apprentissage machine.

Ces nouvelles opportunités en cytologie moderne amènent également un lot de questions ouvertes : Quel microscope choisir pour faire un tri de cellules ? Est-ce qu'une super résolution est indispensable ? Est-ce qu'une image 3D est nécessaire ? Comment accélérer le débit de l'imagerie pour atteindre un haut débit sans augmenter le coût de l'expérimentation ? La réponse à ces questions dépend bien sûr de la question biologique posée mais la méthodologie pour y répondre peut-être générique. Nous les abordons avec une approche originale de simulation numérique en nous penchant sur des cellules étudiées dans le domaine de la cancérologie. Nous montrons l'apport de la simulation pour de l'instrumentation virtuelle et pour de l'augmentation de données en apprentissage machine.

Sur cellules uniques, nous montrons que lorsqu'une tâche de tri est seulement visée, il est possible de recourir à la microscopie sous-résolue en utilisant des caractéristiques texturales classiques aussi efficacement que les caractéristiques pointillistes basées sur des microscopes super-résolus. Ensuite, nous montrons, pour différentes techniques de microscopies, que les images 2D pourraient être utilisées au lieu des images 3D avec une magnitude de performance similaire. Puis, nous prouvons que l'imagerie diffractive, plus simple et compact d'utilisation, pourrait être utilisée au lieu de l'imagerie conventionnelle sans perte de la performance de tri. Enfin, nous montrons que l'effet de flou apporté par la microfluidique peut être négligeable sur le tri de cellules. Sur agrégats cellulaires, la détection individuelle de cellules est fortement dépendante de la qualité des images acquises. Un facteur important permettant d'avoir des images de haute qualité est la clarification chimique des échantillons. Néanmoins, ces méthodes sont invasives et coûteuses en termes de préparation des échantillons. Dans une deuxième partie de la thèse, nous montrons la puissance de l'apprentissage profond pour réaliser une clarification numérique des échantillons par apprentissage de type transfert.

Mots clés : microscopie de fluorescence, système microfluidique, cellule unique, tri des cellules, simulation d'images microscopiques, apprentissage machine, instrumentation virtuelle, sphéroïde, clarification numérique

SIMULATION AND MACHINE LEARNING FOR IMAGE ANALYSIS OF SINGLE CELLS BASED ON FLUORESCENCE MICROSCOPY IN MICROFLUIDICS**Abstract**

This thesis is conducted in the context of the study of isolated cells, i.e. cytology. This branch of life analysis is in full evolution thanks to revolutionary technological contributions. Thus, with the advent of microfluidics, cells can now be automatically brought under a microscope where they were classically sorted according to one-dimensional spectrometric signatures. Furthermore, thanks to studies on organoids and tissue transparencies, it is possible to observe in situ and in a minimally invasive way the shape and individual textures of cells in three-dimensional aggregates. The power of these technological developments in cytology is potentially increased tenfold when combined with the diversity of fluorescence microscopy modalities or artificial intelligence through machine learning.

These new opportunities in modern cytology also bring a lot of open questions: Which microscope to choose for cell sorting? Is a super resolution essential? Is a 3D image necessary? How to accelerate the imaging throughput to reach a high throughput without increasing the cost of the experiment? The answer to these questions depends of course on the biological question asked but the methodology to answer them can be generic. We address them with an original approach of numerical simulation by looking at cells studied in the field of cancerology. We show the contribution of simulation for virtual instrumentation and for data augmentation in machine learning.

On single cells, we show that when a sorting task is only targeted, it is possible to use sub-resolved microscopy using classical textural features as efficiently as pointillistic features based on super-resolved microscopes. Then, we show, for different microscopy techniques, that 2D images could be used instead of 3D images with a similar performance magnitude. Then, we prove that diffractive imaging, simpler and more compact to use, could be used instead of conventional imaging without loss of sorting performance. Finally, we show that the blurring effect brought by microfluidics can be negligible on cell sorting. On cell aggregates, individual cell detection is strongly dependent on the quality of the acquired images. An important factor to obtain high quality images is the chemical clarification of the samples. However, these methods are invasive and costly in terms of sample preparation. In a second part of the thesis, we show the power of deep learning to achieve digital clarification of samples by transfer learning.

Keywords: fluorescence microscopy, microfluidic system, single cells, cell sorting, microscopy images simulation, machine learning, virtual instrumentation, spheroids, digital clearing

Remerciements

À l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance et mes remerciements à mon superviseur de thèse, M. David ROUSSEAU, pour m'avoir fait confiance au cours de ces trois années. Merci pour toutes les heures qu'il a consacrées pour diriger ce travail et pour toutes les opportunités qu'il m'a proposées. Aussi, je le remercie pour son soutien, son enthousiasme et pour les nombreux conseils qu'il a su me prodiguer tant dans le cadre de mes activités scientifiques et professionnelles que dans la rédaction du manuscrit. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité malgré ses multiples responsabilités.

Je remercie sincèrement mon encadrante de thèse, Mme Carole FRINDEL, qui m'a toujours aidé avec bienveillance et bonne humeur. Je te remercie pour tes conseils scientifiques, pour ton suivi tout le long des trois années de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail.

Je tiens à saluer également tous les membres de mon comité de thèse pour les discussions scientifiques passionnantes que nous avons pu avoir durant les journées semestrielles.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire CREATIS à Lyon ainsi que les collègues et les camarades du laboratoire LARIS - IRHS à Angers. En particulier, je remercie Noëlie Debs, Théo Jourdan, Mégane Decroocq, Audrey Duran, Étienne Belin, Salma Samiei, Pejman Rasti, Mouad Zine El Abidine, Hadhami Garbougé, Helin Dutagaci, Angelina El Ghaziri. Je suis très reconnaissant pour votre bienveillance, votre ambiance chaleureuse et pour votre aide permanente.

Je tiens à remercier également Guillaume VANEL, l'ingénieur de recherche avec qui j'ai travaillé sur une partie de ma thèse.

De plus, je voulais remercier les partenaires avec qui j'ai travaillé et collaboré dans le cadre du projet PROCHIP :

- Mark Neil et Hai Gong de l'Imperial College à Londres,
- Andrea Bassi, Francesca Bragheri, Federico Sala et Petra Paie du département de physique de l'École Polytechnique du Milan,
- Alessio Zippo and Sarah Dannunzio du laboratoire de biologie de la chromatine et d'épigénétique (CIBIO) de l'université de Trento,
- Gaëlle Recher du laboratoire Photonique Numérique & Nanosciences (LP2N) de l'Université de Bordeaux et Charlotte Riviere de l'institut Lumière Matière (ILM) de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Je vous remercie vivement pour votre aide, pour les échanges scientifiques que l'on a eus et votre bonne humeur.

Mon environnement social personnel a également joué un rôle important dans la réussite de mon doctorat par le soutien, l'ouverture et les moments de décompression qu'il m'a apporté. Je remercie vivement tous mes amis et mes proches...

Mes reconnaissances et mes remerciements les plus chaleureux vont envers toute ma famille. Ma mère, mes frères et mes sœurs, votre soutien inconditionnel et votre encouragement m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Je remercie également une personne spéciale et ma meilleure amie pour la vie, pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en générale...

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis directement ou indirectement d'avoir la chance de travailler sur cette thèse et d'aller jusqu'au bout de mon doctorat.

Table des matières

Résumé	ix
Remerciements	xi
Table des matières	xiii
Liste des tableaux	xvii
Table des figures	xix
1 Analyse de cellules uniques : enjeux et défis	1
1.1 Introduction	3
1.2 Vue sur les systèmes microfluidiques	4
1.3 Microscopie microfluidique	5
1.3.1 Fonction d'étalement du point (PSF) et résolution optique . . .	6
1.3.2 Les modalités de microscopie à fluorescence	6
1.3.3 Les défis en microscopie à fluorescence	8
1.3.4 Modalité d'imagerie sans lentille	9
1.4 Traitement des images microscopiques	10
1.5 Les agrégats des cellules : les sphéroïdes	11
1.5.1 Les défis en imagerie des sphéroïdes	11
1.5.2 Les défis en analyse des cellules en sphéroïdes	11
1.6 Problématique scientifique et objectifs de la thèse	13
1.7 Cas d'usage : Analyse des cellules cancéreuses par imagerie cytologique	15
1.7.1 Projet PROCHIP	15
1.7.2 Microscopie à fluorescence	17
1.7.3 Systèmes micro-fluidiques	19
1.7.4 Préparation des échantillons	23
1.7.5 Les approches de traitement d'images des cellules uniques . .	24
1.7.6 Les algorithmes en apprentissage machines	34
1.8 Conclusion et organisation du document	37
2 Classification d'images de cellules uniques	39
2.1 Introduction	40
2.2 Simulation d'images de microscopie à fluorescence de cellules uniques	43
2.3 Donnée réelles	45
2.4 Localisation des marqueurs fluorescents	46
2.5 Traitement des images	48

2.5.1	Extraction des caractéristiques	48
2.5.2	Classification	50
2.6	Résultats de la classification	51
2.6.1	Cas de différences de densité des marqueurs	51
2.6.2	Cas de différences d'organisation spatiale des marqueurs	52
2.6.3	Test sur données réelles	52
2.7	Conclusion	55
3	Optimisation des coûts microscopiques pour le tri de cellules uniques	59
3.1	Introduction	60
3.2	Simulation d'images de cellules uniques en microscopie confocale	61
3.2.1	Simulation de chaînes 3D de chromatine et de marqueurs fluorescents	61
3.2.2	Modélisation de la fonction d'étalement du point	62
3.2.3	Simulation des images microscopiques	64
3.3	Traitement des images	66
3.3.1	Extraction des caractéristiques texturales	66
3.3.2	Classification	67
3.4	Résultats et discussion	68
3.4.1	Images simulées	68
3.4.2	Images réelles	69
3.5	Conclusion	72
4	Effet de la microfluidique sur le tri de cellules uniques	75
4.1	Introduction	76
4.2	Acquisition des images	76
4.3	Simulation d'images de cellules uniques par LSM	78
4.3.1	Nuage de points 3D de marqueurs fluorescents (P_c)	79
4.3.2	Fonction d'étalement du point expérimentale (PSF 3D)	81
4.3.3	Simulation des artefacts microfluidiques (η)	81
4.3.4	Simulation du bruit de la caméra : (β)	82
4.3.5	Images de cellules uniques 3D simulée (I_{LSFM})	82
4.4	Analyse d'images	83
4.4.1	Extraction des caractéristiques texturales et classification	83
4.4.2	Débruitage d'images	84
4.5	Résultats et discussion	86
4.5.1	Analyse d'images simulées	86
4.5.2	Analyse d'images réelles	87
4.6	Conclusion	92
5	Vers une clarification numérique en imagerie des sphéroïdes	95
5.1	Introduction	97
5.2	Préparation et acquisition d'images des échantillons de sphéroïdes	98
5.2.1	Formation de sphéroïdes dans des microsystemes à base d'agarose	98
5.2.2	Marquage de cellules dans les sphéroïdes	100
5.2.3	Clarification des échantillons	100
5.2.4	Acquisition d'images de sphéroïdes	101
5.3	Annotation des données	101

5.4	Normalisation des sphéroïdes en profondeur z	102
5.5	Évaluation de la qualité des images sur la base de métriques locales . .	102
5.6	Méthodes de segmentation par apprentissage profond	103
5.6.1	Unet	104
5.6.2	Post-traitement basé sur la Morphologie Dynamique (DM) . . .	104
5.6.3	Dist	105
5.6.4	Stardist	106
5.7	Fonctions de perte d'apprentissage et métriques d'évaluation de la seg- mentation	107
5.7.1	Fonctions de perte	107
5.7.2	Métriques d'évaluation de la performance de segmentation . .	108
5.8	Optimisation des hyper-paramètres	108
5.9	Apprentissage par transfert	110
5.10	Résultats et discussion	110
5.10.1	Comparaison des méthodes de clarification avec les métriques locales	110
5.10.2	Segmentation des images 2D des sphéroïdes	111
5.10.3	Transférabilité des modèles de segmentation à d'autres ensembles de données	113
5.10.4	Faisabilité de la clarification numérique des sphéroïdes	116
5.11	Conclusion	119
Conclusion et perspectives		125
A Les descripteurs d'Haralick		131
B Optimisation des classifieurs		135
C MicroVIP : outil de simulation et d'analyse d'images de microscopie à fluo- rescence sur la plate-forme VIP		139
Bibliographie		145

Liste des tableaux

2.1	Résultats de la classification des données réelles	54
2.2	Temps de calcul des caractéristiques texturale et pointilliste	54
3.1	Exemples de résolutions latérales ($\sigma_{r,c}$) et axiales ($\sigma_{z,c}$) des PSFs 3D simulées en fonction des valeurs de l'ouverture numérique NA . Lorsque la valeur de NA diminue, la résolution diminue.	64
3.2	Résultats de classification des données réelles	71
3.3	Nombre et temps de calcul pour chaque type de caractéristique en 2D et 3D	72
4.1	Description des données réelles	78
4.2	Performance de classification des images réelles	90
4.3	Temps de calcul pour chaque type de caractéristique	90
5.1	Valeurs des paramètres optimisés	110
5.2	Résultats de segmentation des sphéroïdes	114
B.1	Performance de classification basée sur les caractéristiques de la fonction d'auto-correlation couplé à quatre classifieurs.	136
B.2	Performance de classification basée sur les caractéristiques GLCM couplé à quatre classifieurs.	136
B.3	Performance de classification basée sur les caractéristiques LBP couplé à quatre classifieurs.	136
B.4	Performance de classification basée sur les caractéristiques pointillistes de distribution de la distance couplé à quatre classifieurs.	137
B.5	Performance de classification basée sur les caractéristiques pointillistes de la fonction \hat{K} de Ripley couplé à quatre classifieurs.	137
B.6	Résultats de la classification entre les populations des cellules avec quatre classifieurs	137

Table des figures

1.1	Illustration d'un système microfluidique	4
1.2	Fonction d'étalement du point (PSF)	7
1.3	Différences entre les résolutions d'images acquises avec différentes techniques de microscopie	8
1.4	Imagerie sans lentille par diffraction vs imagerie conventionnelle . . .	10
1.5	Modèle d'un sphéroïde en 3D avant et après la clarification optique .	12
1.6	Structure de la chromatine	16
1.7	Schéma global des objectifs du projet PROCHIP	17
1.8	Principe de la microscopie confocale	18
1.9	Principe d'un microscope à feuillet de lumière	20
1.10	Schéma du système microfluidique avec LSFM	22
1.11	Image d'une cellule unique acquise avec le microscope microfluidique à feuillet de lumière	23
1.12	Système microfluidique à micro-puits	23
1.13	Ajustement des distances avec des distributions statistiques	26
1.14	Fonction \hat{K} de Ripley selon le type de la distribution spatiale des marqueurs	27
1.15	Matrice de co-occurrence des niveaux de gris	29
1.16	Principe de LBP	30
1.17	Principe de LBP-TOP	31
1.18	Principe de la transformée en scattering (scattering transform)	32
1.19	Image à la sortie du réseau de la transformée en scattering	33
1.20	Principe de Machine à vecteurs de support (SVMs)	35
1.21	Architecture basique de CNN	36
2.1	Image réelle vs image simulée	41
2.2	Noyaux de cellules acquises avec des microscopies sous et super-résolues	42
2.3	Résumé visuel de l'étude	44
2.4	Génération des images de cellules uniques réelles	46
2.5	Performance d'UNLOC pour la localisation des marqueurs fluorescents	48
2.6	Fonction $\hat{K}(r, n)$ de Ripley pour les distributions aléatoire et en grappes	49
2.7	Performance de classification pour les classes de cellules avec une différence de densité des marqueurs	53
2.8	Courbe de la fonction $\hat{K}(r, n)$ de Ripley en fonction du rayon r sans l'effet de diffraction de microscope	54
2.9	Performance de classification binaire pour la différence de densité de marqueurs sans l'effet de diffraction de microscope	55

2.10	Performance de classification pour les classes de cellules avec une différence de distribution des marqueurs	56
2.11	Influence de la taille du PSF (rapport k) sur les fonctions de Ripley $\hat{K}(r, n)$ des marqueurs localisés en utilisant UNLOC	57
3.1	Illustration des cellules dans le domaine spatial et spectral	61
3.2	Schéma global de l'étude sur l'optimisation	63
3.3	Illustration des plans médians XY, XZ et YZ pour une PSF confocale 3D générée pour une ouverture numérique $NA = 1$	65
3.4	Génération des classes de cellules pour différentes organisations spatiales des marqueurs	66
3.5	Performance de classification des cellules uniques en fonction de l'ouverture numérique (NA)	70
4.1	Exemples des images réelles des cellules uniques acquises avec le LSMF microfluidique	78
4.2	Effet de microfluidique sur le nombre des tranches z acquises pour une image	79
4.3	Schéma de simulation des images	80
4.4	Images simulées en fonction de la vitesse de cellules	83
4.5	Performance de classification des images simulées en fonction de la vitesse des cellules	87
4.6	Débruitage des images synthétiques avec CARE	88
4.7	Débruitage des images réelles	91
4.8	Images des cellules réelles mal classées	93
5.1	Clarification numérique : schéma générale de l'étude	99
5.2	Définition des patches pour le calcul des métriques locales.	103
5.3	Sorties des méthodes de segmentation par apprentissage profond	105
5.4	Optimisation des hyper-paramètres	109
5.5	Comparaison des méthodes de clarification avec les métriques locales	112
5.6	Résultats de la segmentation en fonction des profondeurs (z)	115
5.7	Évaluation de la transférabilité des données	116
5.8	Analyse de l'effet de la clarification numérique	118
5.9	Reconstruction 3D et comptage de noyaux en 3D	121
5.10	Cartes de segmentation finales pour les images de contrôle et RapiClear.	122
5.11	Cartes de segmentation finale pour les images Glycérol et TDE	123
5.12	Cartes de segmentation finale pour les images ScaleS et CUBIC	124
B.1	Optimisation de la taille des hyper-paramètres de GLCM et LBP	138
C.1	Schéma globale de l'outil de simulation et d'analyse des images de microscopie : MicroVIP	141
C.2	Exemples d'images microscopiques simulées avec différentes modalités de microscopie avec MicroVIP	142
C.3	MicroVIP : temps de simulation en fonction du nombre de cellules	143

Analyse de cellules uniques : enjeux et défis

Sommaire du présent chapitre

1.1 Introduction	3
1.2 Vue sur les systèmes microfluidiques	4
1.3 Microscopie microfluidique	5
1.3.1 Fonction d'étalement du point (PSF) et résolution optique	6
1.3.2 Les modalités de microscopie à fluorescence	6
1.3.3 Les défis en microscopie à fluorescence	8
1.3.4 Modalité d'imagerie sans lentille	9
1.4 Traitement des images microscopiques	10
1.5 Les agrégats des cellules : les sphéroïdes	11
1.5.1 Les défis en imagerie des sphéroïdes	11
1.5.2 Les défis en analyse des cellules en sphéroïdes	11
1.6 Problématique scientifique et objectifs de la thèse	13
1.7 Cas d'usage : Analyse des cellules cancéreuses par imagerie cyto-	
 logique	15
1.7.1 Projet PROCHIP	15
1.7.2 Microscopie à fluorescence	17
1.7.3 Systèmes micro-fluidiques	19
1.7.4 Préparation des échantillons	23
1.7.5 Les approches de traitement d'images des cellules uniques .	24
1.7.6 Les algorithmes en apprentissage machines	34

1.8 Conclusion et organisation du document

Dans ce premier chapitre introductif, nous présentons un aperçu général sur les différents enjeux en cytométrie pour le tri et l'analyse de cellules uniques. Nous décrivons également les différentes techniques d'analyse des cellules uniques, notamment les méthodes basées sur les systèmes microfluidiques, la microscopie à fluorescence et les méthodes de traitement des images. Puis nous explicitons la problématique scientifique générale de cette thèse. Dans une deuxième partie, nous détaillons le contexte pratique, les objectifs spécifiques de la thèse, les méthodologies et techniques utilisés pour résoudre les différentes problématiques. Finalement, nous présentons en conclusion, l'organisation du document.

1.1 Introduction

Dans une forêt de cent mille arbres, il n'y a pas deux feuilles identiques. De même, dans le corps humain, il n'y a pas deux cellules similaires dans un groupe génétiquement identique. L'analyse de cette hétérogénéité cellulaire a été reconnue comme une étape vitale pour l'interprétation correcte des résultats diagnostiques et thérapeutiques des maladies, tels que les métastases tumorales [1, 2], la résistance aux médicaments [3] et la différenciation des cellules souches [4, 5]. Cependant, cette analyse a été longtemps masquée par l'étude des réponses moyennes d'une population des cellules. Or, pour pouvoir identifier les différences entre les cellules, il est nécessaire de procéder à diverses manipulations et à une analyse complète au niveau des cellules uniques.

Depuis de nombreuses décennies, l'utilisation d'outils biologiques traditionnels, comme les boîtes de Pétri et les plaques de puits a été reconnue comme une solution pour l'isolement des cellules. Toutefois, ces outils sont techniquement difficiles pour manipuler et analyser des cellules uniques de petite taille et à faible concentration de bio-molécules cibles [6]. Ainsi, la cytométrie de flux, la méthode classique, qui permet de trier rapidement les cellules marquées par fluorescence dans un flux, a été développée et reconnue comme une méthode standard pour l'analyse des cellules uniques [7, 8]. Cette méthode est automatique, et elle permet la détection multiple et efficace pour le tri cellulaire. Néanmoins la cytométrie de flux est encombrante, mécaniquement compliquée, coûteuse et exigeante pour des volumes d'échantillons relativement importants. En outre, elle ne peut être utilisée que pour analyser les cellules à un moment donné, c'est-à-dire qu'il est impossible d'utiliser la cytométrie de flux pour surveiller en permanence la dynamique cellulaire [6]. Le développement de la microfluidique, qui permet de manipuler et contrôler des fluides de l'ordre du micro au pico-litre dans des réseaux de microcanaux, ouvre la voie à l'étude de cellules uniques et des interactions cellulaires dans des agrégats comme dans les modèles

des sphéroïdes [9]. La microfluidique a connu un essor considérable depuis près de deux décennies [10, 11] et permet d'envisager des approches révolutionnaires pour la cytométrie.

1.2 Vue sur les systèmes microfluidiques

Par définition, un système microfluidique est un dispositif miniaturisé formé d'un ensemble de microcanaux gravés ou moulés dans un matériau (verre, silicium ou polymère tel que le PDMS pour PolyDiMethylSiloxane) [12]. Les microcanaux constituant la puce microfluidique sont connectés entre eux de manière à réaliser une fonctionnalité spécifique tels que mélanges, pompage, tri, ou contrôle de l'environnement biochimique. Ce réseau de microcanaux enfermé dans la puce microfluidique est relié à l'extérieur par des entrées et des sorties percées à travers la puce, comme des interfaces entre le monde macro et micro [13, 14] (voir figure 1.1). C'est par ces trous que les liquides sont injectés et évacués de la puce microfluidique avec des systèmes extérieurs tels qu'un contrôleur de pression ou une pompe péristaltique, etc [15, 16].

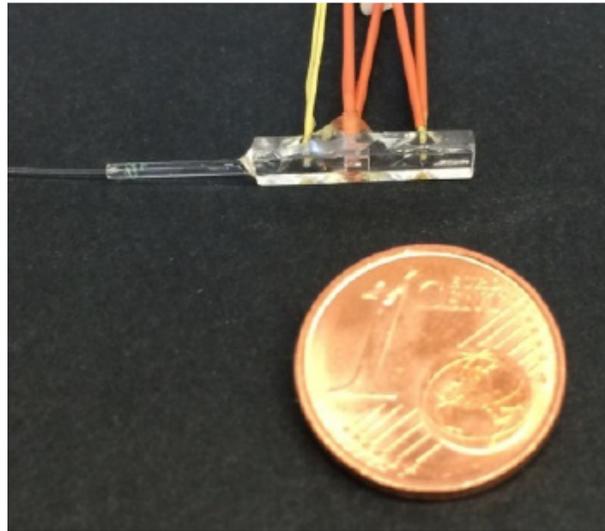


FIGURE 1.1 – Illustration d'un système microfluidique avec les tubes d'entrée et de sortie en comparaison avec une pièce de monnaie de 1 centime d'euro. Figure reproduite à partir de la base de données du projet.

Les progrès de la microfluidique ont permis plusieurs types de manipulation des cellules uniques. Nous pouvons citer par exemple, les méthodes hydrodynamiques comme la microfluidique en gouttelettes et la microfluidique basée sur les tourbillons, les méthodes mécaniques comme les manipulations par des microvalves, des microstructures ou des micro puits, etc [17, 18]. Ces méthodes permettent d'isoler les populations en cellules uniques pour une tâche d'analyse [19, 20], de cultiver des échantillons

biologiques directement sur une puce [21, 22], de contrôler l'environnement dans lequel les systèmes cellulaires se développent, d'injecter des nutriments et des médicaments [9, 23], et aussi de reproduire les conditions dynamiques présentes dans un organe vivant [24]. En plus, diverses fonctionnalités analytiques, notamment les réseaux de microélectrodes, la spectrométrie de masse et la chromatographie, peuvent être intégrées aux composants microfluidiques pour diverses applications d'analyse qualitative et quantitative de cellules uniques [6, 25, 26]. Bien que ces systèmes soient efficaces pour certaines tâches comme le tri des cellules, les analyses liées sont limitées aux signatures d'absorption spectro-métrique traditionnelles ou aux signatures de diffusion détectées lors du passage des cellules. Ainsi, elles sont incapables d'extraire des informations résolues dans l'espace qui sont souvent essentielles pour quantifier des phénotypes cellulaires complexes. Grâce à la cytométrie par imagerie [27, 28, 29], utilisant les techniques de microscopie à fluorescence, l'analyse exhaustive à haut débit de l'hétérogénéité cellulaire basée sur des caractéristiques 2D et 3D spatiales individuelles (comme par exemple la forme, la texture, la taille, etc) est maintenant possible [30, 31]. Ce couplage de la microfluidique avec les microscopes à fluorescence a ouvert une nouvelle ère pour la cytométrie rapide. Cependant, pour une analyse résolue et performante, il est nécessaire de définir la technique de microscopie et la résolution des images adéquates en lien avec le type d'analyse visée.

1.3 Microscopie à fluorescence : une révolution dans le monde de l'imagerie microscopique

Au cours des deux dernières décennies, la microscopie a bénéficié de plusieurs révolutions scientifiques. Par exemple, des innovations en chimie via la production de nouveaux marqueurs fluorescents ou en optique avec des lasers accordables à la fois en longueur d'onde et en durée d'impulsion [32]. La microscopie à fluorescence se base principalement sur le marquage des échantillons par des bio-molécules fluorescentes appelées les fluorophores. Lorsque l'échantillon est irradié par un laser à une bande spécifique de longueurs d'onde, ces longueurs d'onde seront absorbées par les fluorophores et une lumière de plus grande longueur d'onde est émise. À travers des filtres optiques, seules les longueurs d'onde spécifiques de la lumière émise atteignent le détecteur pour former une image [33, 34]. Contrairement à la microscopie classique, où l'échantillon est observé avec la lumière incidente, la microscopie à fluorescence utilise la différence entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour bloquer la lumière incidente, ce qui permet d'obtenir une image présentant un contraste élevé entre l'échantillon et le fond.

1.3.1 Fonction d'étalement du point (PSF) et résolution optique

Un élément important en microscopie est la fonction d'étalement du point (PSF, *pour point spread function*). Cette fonction est définie comme la réponse impulsionnelle d'un microscope qui contrôle la résolution d'une image. En microscopie, l'image d'une source ponctuelle, n'est plus un point, mais plutôt une tache floue appelée la figure de diffraction (ou tache d'Airy) (voir figure 1.2.A). La fonction d'étalement du point (PSF) décrit la relation entre l'objet ponctuel et la réponse floue produite dans le microscope. Une image provenant d'un microscope consiste en une somme de toutes les PSFs des objets ponctuels de l'échantillon. Ainsi, une PSF à une largeur à mi-hauteur (FWHM, *pour Full Width at Half Maximum*) plus grande diminue la résolution de l'image acquise. Cette fonction est généralement plus allongée dans la direction z (axiale) que dans la direction xy (latérale) ($r_{axiale} > r_{latérale}$) comme montré dans la figure 1.2.A.

Un autre terme important en imagerie microscopique est la résolution optique. Elle est définie par le pouvoir d'un système microscopique à séparer l'image de deux fluorophores dans l'échantillon qui sont séparés par une distance d . Selon le critère de Rayleigh [35], la distance minimale entre deux points pour qu'on puisse les distinguer est défini par,

$$d_R = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (1.1)$$

avec, d_R est la distance de Rayleigh, λ est la longueur d'onde du laser et NA l'ouverture numérique de l'objectif. Selon l'équation (1.1), deux points sont résolus si $d > d_R$, à la limite de résolution (limite de diffraction) si $d = d_R$ et sont non résolus si $d < d_R$. Une illustration de ces trois cas est montrée dans la figure 1.2.B.

1.3.2 Les modalités de microscopie à fluorescence

Les révolutions scientifiques en chimie des fluorophores ont permis l'apparition des techniques de microscopie de résolution intermédiaire à super-résolution en minimisant la taille de la PSF. Nous citons par exemple, la microscopie à champ large, la microscopie confocale à balayage laser [36], la microscopie de fluorescence à feuillet de lumière (LSFM, *pour Light-Sheet Fluorescence Microscopy*) [37, 38], la microscopie à illumination structurée (SIM, *pour Structured Illumination Microscopy (SIM)*) [39], la microscopie à déplétion par émission stimulée (STED, *pour Stimulated-Emission-Depletion Microscopy*), ou les techniques de microscopie unique de localisation de molécule (SMLM, *pour Single Molecule Localization Microscopy*) [40, 41]. Grâce à ces techniques, la microscopie à fluorescence est devenue l'un des principaux outils de la biomédecine permettant d'observer en 2D ou en 3D des éléments cellulaires à l'intérieur de cellules uniques

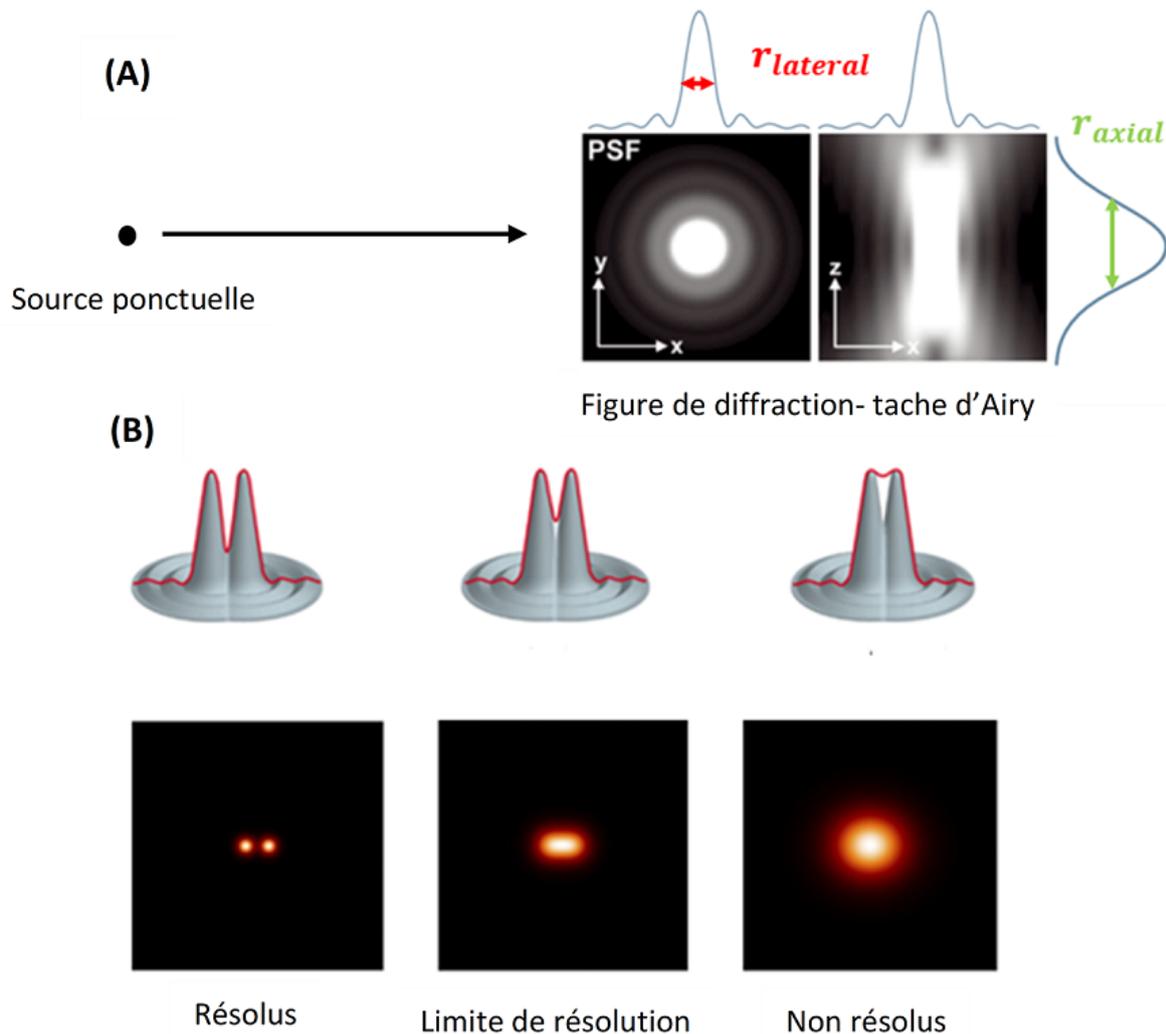


FIGURE 1.2 – La fonction d'étalement du point (PSF) d'un microscope. (A) L'image d'une source ponctuelle est une figure de diffraction (tache d'Airy) d'une largeur à mi-hauteur (FWHM) dans le plan xy de $r_{lateral}$ et dans la direction de z de r_{axial} . (B) Les trois conditions de critère de Rayleigh de deux points sources : points résolus, à la limite de résolution et non résolus qui dépend de la distance d qui les sépare.

avec des résolutions qui vont en dessous du critère de Rayleigh (équation (1.1)) d'un microscope classique [42]. Cependant, chaque modalité de microscope citée présente ces avantages et des limites par rapport aux autres et par suite il faut adapter la technique de microscopie selon l'application visée. Par exemple, les microscopes à champ large sont des systèmes qui permettent l'acquisition rapide d'échantillons fluorescents sur un grand champ de vision, mais ils ne permettent pas le sectionnement optique (la possibilité de sectionner une cellule ou un tissu en tranches virtuelles et en 3D) et peuvent donner lieu à des images de faible contraste et de faible résolution spatiale. Par contre, les microscopes confocaux ont été développés pour résoudre ce problème, mais ils sont fortement affectés par le photo-blanchiment et la photo-toxicité ce qui

est parfois limitant pour de l'imagerie au cours du temps d'échantillons biologiques. Les LSFMs combinent la capacité de sectionnement optique, typique des systèmes confocaux, avec la possibilité de balayer rapidement un grand champ de vision, typique de la microscopie à champ large résultant d'une imagerie à une vitesse d'acquisition élevée sur des échantillons 3D étendus et une phototoxicité réduite par rapport à la microscopie confocale. Les SIMs permettent d'obtenir un gain de résolution d'un facteur de 2 sur toutes les directions. Tandis que les SMLMs permettent une détection individuelle des fluorophores à haute résolution, mais ils ont un coût élevé en termes de dispositif optique, de système de micro-positionnement, du temps d'acquisition et de taille de la mémoire numérique [42, 43, 44]. Une illustration de la différence en résolution d'image pour les techniques de microscopie à fluorescence à champ large, confocale, SIM et SMLM est présentée dans la figure 1.3.

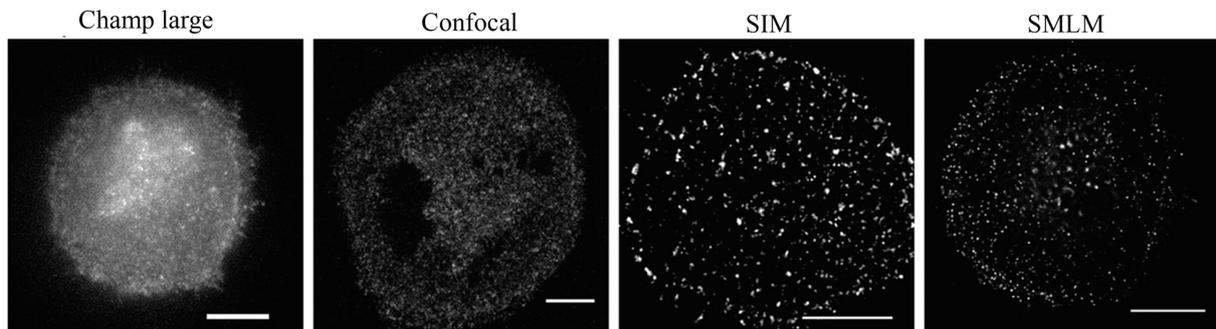


FIGURE 1.3 – Illustration de la différence en résolution d'image pour les techniques de microscopie à fluorescence à champ large, confocale, SIM et SMLM. Barre d'échelle=10 μm . Les cellules visualisées sont des cellules squameuses orales (VB6) marquées à l'aide du fluorophore Alexa Fluor 647 pour visualiser la protéine ITGB1.

Figure modifiée à partir de [45].

1.3.3 Les défis en microscopie à fluorescence

Certaines techniques de microscopie à fluorescence sont largement utilisées conjointement aux systèmes microfluidiques (laboratoire sur puce, Lab-On-Chip). En effet, ces techniques sont intégrées à des systèmes microfluidiques afin d'observer, à haut débit, des échantillons biologiques directement dans le canal microfluidique, généralement en temps différé, à l'échelle de la cellule unique [29, 46, 47, 48]. Cependant, dans ce contexte, les techniques de microscopie super-résolues ne sont pas utilisées dans des applications industrielles ni même dans des plateformes de microscopie ouvertes à des utilisateurs qui ne sont pas experts en instrumentation. Une des raisons qui explique ce retard est que la super-résolution s'accompagne de contraintes en termes de micro-positionnement qui sont d'autant plus exigeantes que la taille de la fonction d'étalement

du point du microscope est petite. Une façon de relâcher ces contraintes consiste à coupler le choix des éléments optiques, c'est-à-dire la conception de la fonction d'étalement du point, conjointement avec la question biologique posée et les pipelines de traitement d'images associés. Nous proposons une telle approche dans cette thèse.

Ainsi, une question importante, non étudiée dans la littérature et qui représente un défi dans le domaine, est de déterminer les limites des vitesses de passage des cellules dans les microcanaux et d'étudier l'effet des artefacts de la microfluidique sur la performance d'analyse des images. Or, l'étude de ces aspects, expérimentalement, est très coûteuse et nécessite une répétition d'expériences avec diverses techniques de microscopie et diverses configurations microfluidiques. Une manière de réduire ces coûts est de s'appuyer sur la simulation numérique. Cette méthodologie permettra de définir les différentes configurations optiques des microscopes et de la microfluidique associée en faisant de l'instrumentation virtuelle. Dans cette thèse, nous étudions l'effet du déplacement des cellules dans le système microfluidique sur l'analyse des images en utilisant la simulation numérique.

1.3.4 Modalité d'imagerie sans lentille

L'imagerie de fluorescence sans lentille (*lens-less imaging, en anglais*) [49] est un outil biomédical prometteur actuellement étudié pour une large gamme d'applications incluant la cytométrie [50, 51, 52, 53]. Cette imagerie consiste à détecter le motif holographique diffracté par l'objet biologique par un capteur sans l'utilisation d'un l'objectif de microscope. Un cas spécifique de l'utilisation de l'imagerie sans lentille est l'imagerie diffractive où le module de la transformée de Fourier est directement capturé via l'acquisition de la figure de diffraction de Fraunhofer [54]. Des algorithmes de traitement d'images issus de l'intelligence artificielle peuvent alors être utilisés pour détecter, analyser et même classifier les objets biologiques observés grâce au suivi d'indicateurs spécifiques dans cette figure de diffraction non directement interprétable par un humain. Cette technique d'imagerie présente l'avantage de simplifier la conception optique, ce qui permet d'éviter d'avoir à se positionner très proche de l'échantillon avec des optiques corrigées des aberrations [55]. La figure 1.4 illustre la différence en conception optique entre l'imagerie à fluorescence conventionnelle et l'imagerie sans lentille par diffraction.

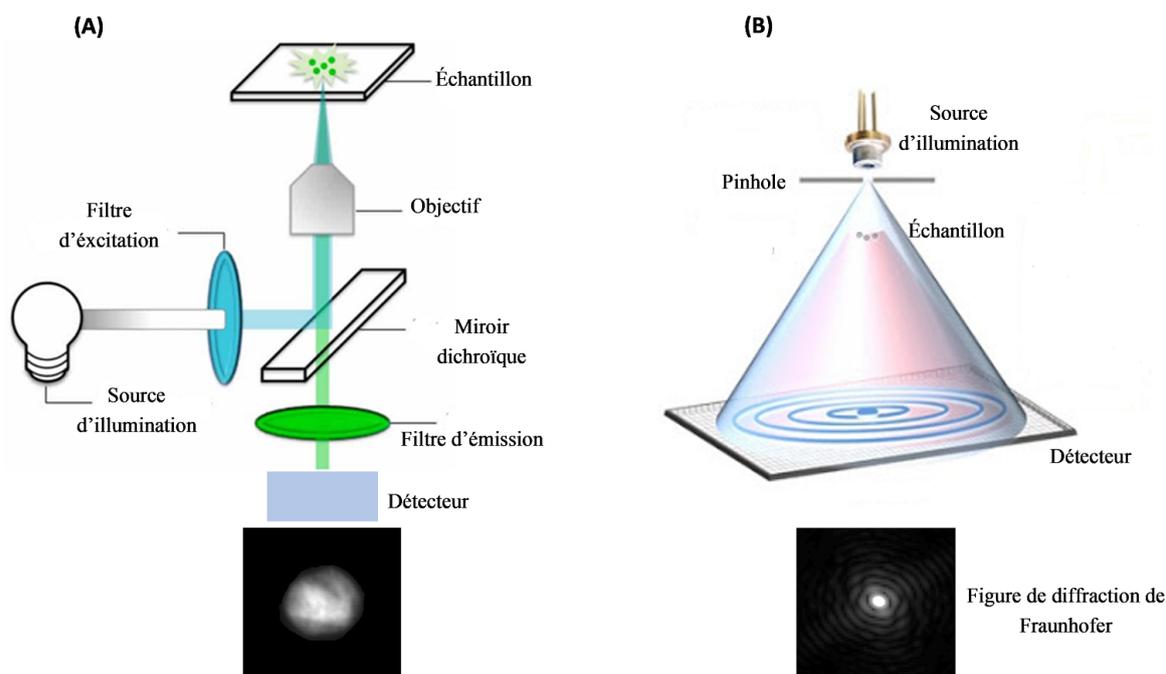


FIGURE 1.4 – Illustration de la différence en conception optique de : (A) l'imagerie à fluorescence conventionnelle et (B) imagerie sans lentille par diffraction. Figure modifiée à partir de [55].

1.4 Traitement des images microscopiques

Les évolutions des techniques de microscopie ont été accompagnées par le développement des algorithmes du traitement d'images dédiés pour l'étude des images 2D et 3D microscopiques [56]. Cependant, l'analyse quantitative des ensembles de données aussi vaste issue des systèmes microfluidiques est un problème de vision par ordinateur difficile à résoudre. Jusqu'à présent, le profilage phénotypique a été abordé à partir de méthodes classiques d'analyse d'image dans une approche ciblée où les caractéristiques spécifiques pertinentes pour le phénotype d'intérêt sont considérées [57, 58]. Cependant, le profilage phénotypique implique une approche moins ciblée, permettant l'identification de nombreuses propriétés de l'échantillon et permettant un large éventail de caractéristiques pour décrire ces propriétés [59, 60]. De telles situations nécessitent des techniques plus avancées reposant sur l'apprentissage automatique [61, 62, 63]. Les algorithmes d'apprentissage automatique ont été largement utilisés pour des applications en microscopie à fluorescence, comme par exemple, la classification d'images basée sur des caractéristiques spatiales des cellules [64], la segmentation de noyaux des cellules [65, 66, 67] et encore le débruitage et la restauration d'images microscopiques [68, 69, 70]. Cependant, ces méthodes impliquent l'annotation manuelle d'une grande quantité de données pour entraîner correctement les algorithmes

d'apprentissage automatique. Ce processus est coûteux en terme de temps et constitue le principal goulot d'étranglement dans le pipeline d'analyse des images. Une possibilité pour surmonter ce problème, est d'utiliser des simulateurs numériques, incluant la structure biologique à imager jusqu'à la physique de l'imagerie, pour simuler des images annotées automatiquement. Nous proposons une telle solution dans cette thèse.

1.5 Les agrégats des cellules : les sphéroïdes

1.5.1 Les défis en imagerie des sphéroïdes

Les sphéroïdes sont des agrégats hétérogènes en prolifération, quiescentes et nécrotiques de systèmes de culture cellulaire tridimensionnels (3D) *in vitro* [71]. Ils ont suscité un intérêt croissant pour le criblage de médicaments en raison de leur capacité à imiter parfaitement les principales caractéristiques des contacts physiologiques de cellule à cellule et de cellule à matrice comme dans les tumeurs solides humaines *in vivo* [72, 73]. En raison de la standardisation de leur production, les sphéroïdes sont devenus un modèle de choix dans le contexte des 3R (remplacer, réduire, raffiner) notamment pour le criblage de médicaments à haut débit [74, 75]. Pourtant, même si les résultats expérimentaux sont souvent quantitatifs, entre chaque sphéroïde de taille contrôlée, ils ne permettent pas d'obtenir des informations sur une seule cellule au sein du sphéroïde lui-même, en raison de son manque d'adaptabilité à la microscopie en profondeur. L'un des principaux défis est la visualisation des sphéroïdes par imagerie de fluorescence, en raison de la diffusion de la lumière qui induit une pénétration en profondeur limitée dans une telle structure opaque et, par conséquent, une faible performance d'analyse des données au niveau de la cellule unique [76, 77]. Une solution pour améliorer la visualisation des sphéroïdes marqués en fluorescence consiste à utiliser des techniques de clarification optique, qui améliorent l'imagerie en profondeur et permettent l'acquisition d'images de haute qualité et l'analyse d'images à haut débit. Le principe de base de la clarification optique est d'uniformiser l'indice optique au sein de la structure 3D, de manière à minimiser la réfraction. L'une des options est d'éliminer les lipides qui contribuent aux effets de réfraction de la lumière, ou de remplacer l'eau par une solution plus proche de l'indice de réfraction des lipides [78, 79, 80, 81, 82, 83]. La figure 1.5 montre une illustration d'un modèle de sphéroïde en 3D avant et après la clarification.

1.5.2 Les défis en analyse des cellules en sphéroïdes

Bien que les méthodes de clarification permettent d'améliorer la qualité des images en profondeur, ces méthodes sont invasives et coûteuses en termes de préparation

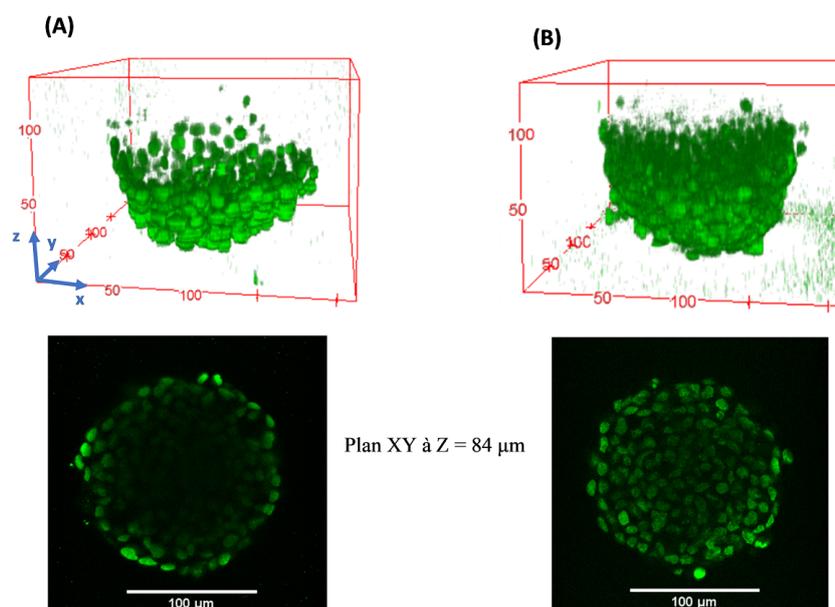


FIGURE 1.5 – Illustration d’un modèle de sphéroïde en 3D acquise avec un microscope confocal à fluorescence. Le réactif NucGreen Dead 488 ReadyProbes est utilisé comme marqueur pour la visualisation de l’ADN dans les noyaux de cellules. (A) Le sphéroïde avant la clarification. (B) Le sphéroïde après la clarification avec la méthode RapiClear. Les plans XY à une profondeur de $z = 84\mu\text{m}$ montre l’amélioration de la qualité de l’image en profondeur.

des échantillons. De plus, il existe une diversité des protocoles délivrant différentes performances de clarification optique. Ainsi, il est nécessaire d’identifier l’effet des méthodes de clarifications sur la qualité des images et d’identifier la meilleure méthode de clarification. Jusqu’à présent, l’évaluation de la qualité de la clarification optique dans les sphéroïdes 3D a été effectuée à l’aide de métriques de qualité locales telles que le rapport signal/bruit (SNR) et le rapport contraste/bruit (CNR) [84, 85, 86]. Cependant, il n’est pas évident de relier les métriques locales aux mesures d’intérêt quantitatives finales. Il nous a donc semblé intéressant de revisiter l’évaluation de la qualité de la clarification en se basant sur les métriques correspondantes à l’analyse visée comme par exemple les métriques de segmentation pour une tâche de détection des cellules uniques dans les sphéroïdes.

Les mesures quantitatives finales pour l’analyse d’image des sphéroïdes à haut débit reposent principalement sur les mesures de la fluorescence des sphéroïdes entiers, l’analyse de la taille et l’invasion de la matrice comme indicateur des effets anti-métastatiques des médicaments [87, 88, 89, 90, 91, 92]. Ces mesures fournissent des informations quantitatives macroscopiques utiles mais ne fournissent pas suffisamment de détails biologiques au niveau de la cellule unique pour évaluer les réponses au traitement, ni

d'analyses quantitatives telles que le comptage des cellules et les études d'agrégation, ni de caractéristiques dans le temps telles que les taux de croissance et de prolifération. Pour surmonter ces limitations, des méthodes de segmentation des noyaux cellulaires individuels ont été développées pour les images de sphéroïdes 2D et 3D [93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100]. Les méthodes existantes dans la littérature pour la segmentation des noyaux cellulaires en microscopie sont actuellement des méthodes basées sur l'apprentissage profond (*Deep Learning*). L'intérêt spécifique pour l'apprentissage profond, par opposition à un pipeline de traitement d'image standard composé d'une étape de débruitage [101] suivie d'une étape de segmentation [102, 103], est d'offrir un processus d'apprentissage de bout en bout où tout le pipeline est optimisé en même temps. Plusieurs architectures ont été développées pour segmenter les noyaux en intégrant deux ou plusieurs canaux dans la sortie de l'architecture d'apprentissage profond ou en appliquant des méthodes de post-traitement sur les cartes de segmentation prédites pour améliorer la qualité des résultats de segmentation [67, 104, 105, 106, 107, 108, 109]. Les méthodes d'apprentissage profond ont été appliquées pour segmenter des sphéroïdes entiers de différentes tailles, formes et conditions d'éclairage [110] et également pour segmenter les noyaux dans les images de sphéroïdes en 3D [111]. Dans ces travaux connexes, une seule méthode de clarification a été étudiée. En revanche, dans cette thèse, nous proposons, dans une perspective d'apprentissage profond, un protocole permettant de comparer plusieurs méthodes de clarification pour la segmentation des noyaux dans les sphéroïdes 3D en microscopie à fluorescence.

1.6 Problématique scientifique et objectifs de la thèse

Dans cette thèse, nous nous intéressons à la tâche du tri des cellules et la détection des cellules dans les agrégats. Le tri des cellules est une application essentielle en microfluidique, qui consiste à identifier les types des cellules d'une manière efficace et rapide. Cette tâche consiste à trier des cellules cibles en fonction de leurs propriétés ou de leur type à partir de mélanges complexes et hétérogènes [7, 112, 113, 114]. Cette étape de tri permettra de trier et d'analyser à haut débit les cellules cancéreuses à différents stades. Tandis que la détection des cellules uniques dans les sphéroïdes permettra d'évaluer les réponses au traitement, l'analyse quantitative telle que le comptage des cellules, les études d'agrégation, et l'analyse des caractéristiques dans le temps telles que le taux de croissance et le taux de prolifération.

Sur la base de la première partie de ce chapitre, nous déduisons que l'analyse des cellules uniques est fortement dépendante de la préparation des échantillons, de la

technique de microscopie utilisée, de la configurations du système microfluidique couplé au microscope et des méthodes de traitement des images associées. Ainsi, les problématiques scientifiques de cette thèse peuvent être reformulées sous la forme de deux problématiques :

1. Quel microscope choisir pour faire un tri de cellules? Est-ce qu'une super résolution est indispensable? Est-ce qu'une image 3D est nécessaire? Comment accélérer le débit de l'imagerie pour atteindre un haut débit sans augmenter le coût de l'expérimentation?
2. Comment identifier la meilleure méthode de clarification des sphéroïdes? Est-il possible de court-circuiter l'étape de clarification en utilisant l'apprentissage automatique?

Trouver le meilleur compromis entre la technique de microscopie, les configurations de la microfluidique, et les méthodes de traitement des images est une tâche extrêmement coûteuse si on ne se base que sur des expérimentations réelles avec différents microscopes, différentes vitesses des cellules et différentes approches de traitement des images. Une solution pour trouver le meilleur compromis repose sur l'usage de simulation numérique. Avec cette méthodologie, d'un coté, il est possible de réduire les coûts expérimentaux en faisant de l'instrumentation virtuelle, en adaptant les paramètres optiques pour une meilleure performance de tri. De plus il est également possible de faire de l'augmentation des données par la génération d'images annotées automatiquement. Nous nous appuyons principalement sur cette approche de simulation pour répondre à la première problématique scientifique identifiée dans cette thèse.

Pour la seconde problématique, liée aux sphéroïdes, nous nous sommes penchés sur l'usage de l'apprentissage profond. Cette méthode d'intelligence artificielle révolutionne actuellement l'imagerie computationnelle [115]. En effet, il permet de lever des contraintes sur la reconstruction des images brutes qui peuvent être directement traitées par les réseaux de neurones sans avoir à passer par la production d'une belle image interprétable par un cerveau humain. Pour résoudre cette deuxième problématique de la thèse, nous nous appuyons donc sur la puissance de l'apprentissage profond, notamment les algorithmes de segmentation, pour déterminer la meilleure méthode de clarification et pour étudier la possibilité de contourner l'étape de la clarification chimique des sphéroïdes via un apprentissage par transfert.

1.7 Cas d'usage : Analyse des cellules cancéreuses par imagerie cytologique

Les problématiques scientifiques soulevées dans la précédente section sont génériques dans le contexte de la cytométrie moderne. Pour ancrer notre approche nous sommes basés sur le cadre expérimental du projet européen H2020 PROCHIP qui finançait cette thèse. Dans cette section, nous décrivons le contexte et les objectifs de ce projet ainsi que l'objectif de la thèse. Nous définissons de façon plus poussée les notions en microscopie et en traitement des images qui ont été utilisées dans les chapitres de ce mémoire.

1.7.1 Projet PROCHIP

Les métastases cancéreuses sont la principale cause de décès chez les patients atteints d'un cancer. La génomique du cancer a montré que la progression des tumeurs vers la formation de métastases est peu soutenue par d'autres altérations génomique, ce qui implique que la capacité d'adaptation des cellules tumorales disséminées dans des micro-environnements étrangers repose sur des altérations dans le domaine de chromatine [116, 117] (voir figure 1.6). Les altérations du domaine chromatinien jouent un rôle central dans la progression du cancer et les métastases, favorisant l'hétérogénéité des tumeurs, ce qui constitue un défi pour un diagnostic précis et une thérapie ciblée. Pour déchiffrer le rôle pathogène de l'hétérogénéité tumorale dans la progression des tumeurs et la réponse thérapeutique, il est essentiel de définir les altérations dans le domaine de la chromatine, au niveau de la cellule unique dans une population de cellules cancéreuses.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet européen PROCHIP (*pour chromatin organization PROfiling with high-throughput super-resolution microscopy on a CHIP*, <https://prochip.eu/>). Ce projet vise à construire un microscope à haute résolution à haut débit dans une puce microfluidique (plus petite qu'une pièce de monnaie), capable de fournir de l'imagerie à haut débit et à haute résolution de centaines de cellules avec une phototoxicité minimale. À partir de cette technique d'imagerie associée à des algorithmes de traitement des images, le cancer sera étudié au niveau de la cellule unique, en triant les échantillons de cancer fraîchement isolés sur la base de leur architecture chromatinienne. Cette technique permettra non seulement d'observer les moindres détails des cellules, mais aussi de les classer en fonction de leur morphologie sous-cellulaire, de leur fonction et de l'expression de leurs gènes colorés par des biomarqueurs. Cette technologie vise à remplacer un certain nombre d'outils actuels de dépistage biologique et

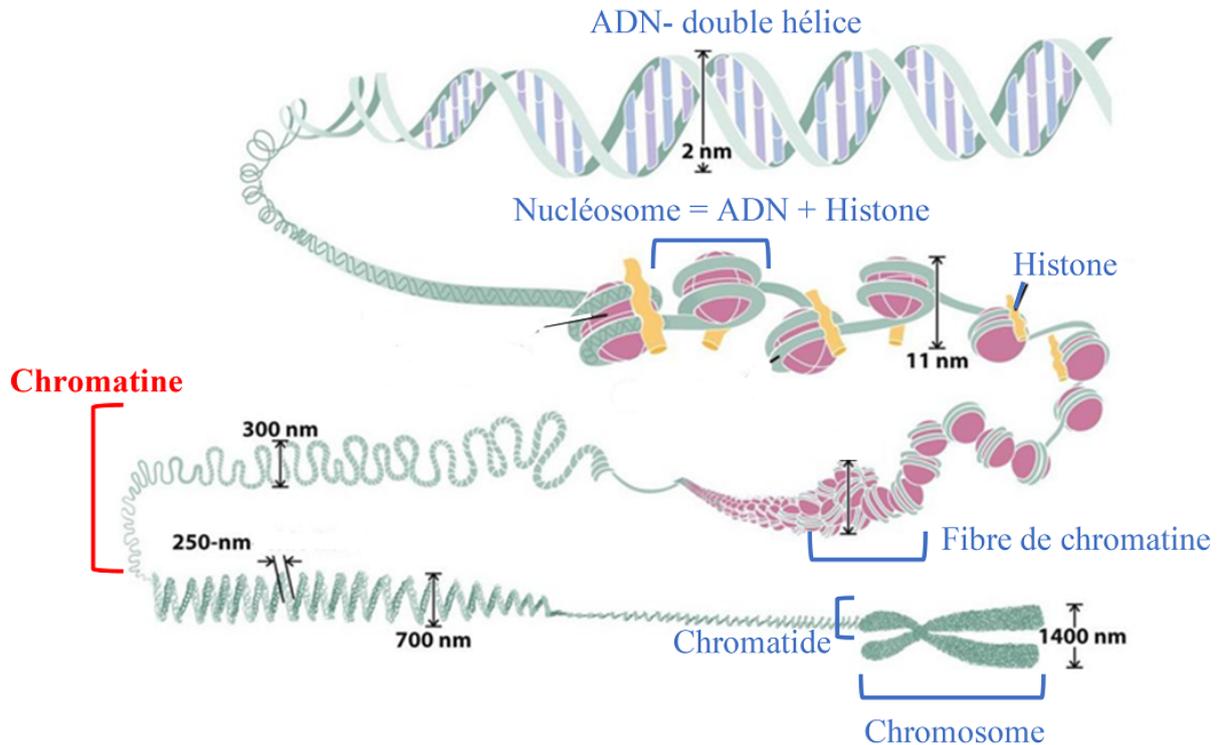


FIGURE 1.6 – La structure de la chromatine. La chromatine est constituée d’une association d’ADN et de protéines de deux types : histones et non-histones. Elle est une composante du chromosome à l’échelle de 300 nm dans le noyau de la cellule. Figure modifiée à partir de [119].

clinique par des dispositifs miniaturisés et intégrés. En favorisant l’intégration de multiples fonctionnalités, il va être possible de manipuler et d’analyser plusieurs cellules et échantillons dans un même laboratoire sur puce, ce qui réduirait radicalement les coûts de dépistage et de phénotypage, accélérerait le développement de médicaments et créerait de nouvelles stratégies de diagnostic clinique. Un schéma global des objectifs du projet est illustré dans la figure 1.7.

En relation avec ces objectifs du projet PROCHIP, l’objectif de cette thèse est de contribuer au tri de cellules uniques. Nous nous concentrons, comme indiqué dans la section 1.6 de ce chapitre, sur le développement d’un simulateur d’images microscopiques permettant de réaliser l’instrumentation virtuelle, c.à.d, définir les meilleures configurations optiques, microfluidiques et de machine learning pour un tri cellulaire optimal. Dans ce qui suit, nous décrivons les différentes manipulations et technologies utilisées pour répondre à cet objectif.

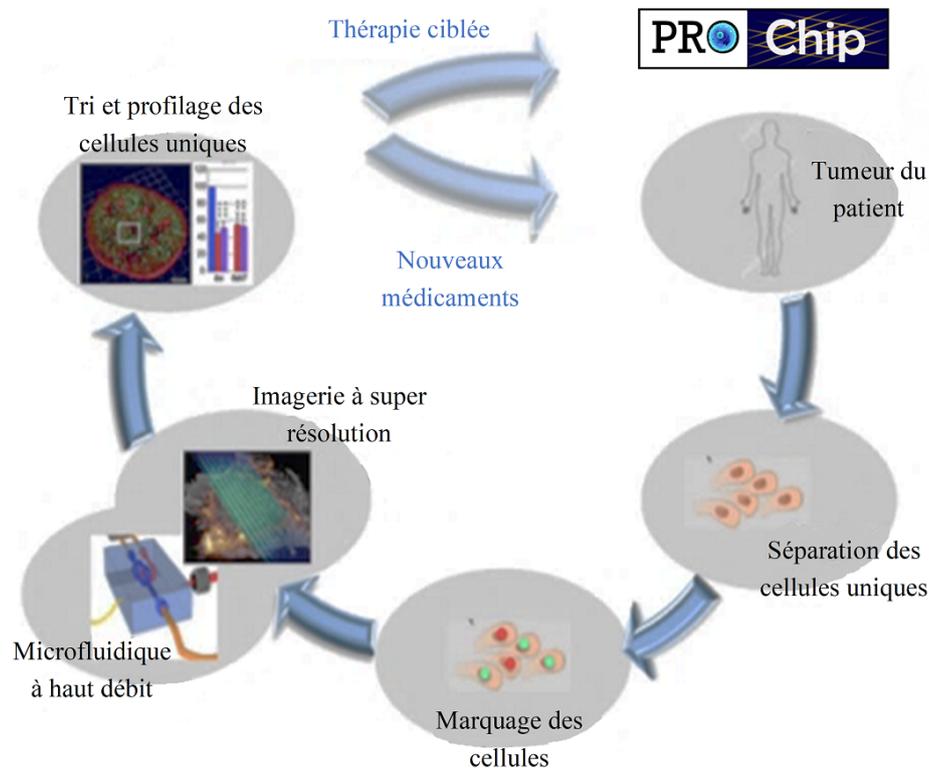


FIGURE 1.7 – Schéma global des objectifs du projet PROCHIP. Figure modifiée à partir de la base de données du projet.

1.7.2 Microscopie à fluorescence

Différentes techniques de microscopie ont été utilisées pour acquérir des images de cellules uniques (la préparation et les types des cellules sont décrits dans la section 1.7.4). Ces techniques sont la microscopie confocale à fluorescence à balayage laser [120] et la microscopie de fluorescence à feuillet de lumière [38]. Nous expliquons dans cette section, le principe de ces deux types de microscopie.

1.7.2.1 Microscopie confocale

Dans un microscope à fluorescence à champ large, l'ensemble de l'échantillon est éclairé en même temps, toutes les émissions de l'échantillon sont collectées, y compris la lumière du fond non focalisée, ce qui induit un flou dans l'image et une fonction d'étalement du point (PSF) très large latéralement et axialement. Par contre, un microscope confocal élimine la lumière émise hors du plan focal en utilisant un éclairage ponctuel et un pinhole (trou) devant le détecteur (caméra) comme montré dans la figure 1.8. La lumière du laser d'excitation est focalisée par l'objectif et cette lumière sera balayée sur l'échantillon ce qui permet de contrôler l'imagerie à différentes profondeurs (sectionne-

ment optique). En conséquence, l'imagerie de plusieurs profondeurs focales permet de reconstruire une image 3D résolue. La microscopie confocale présente plusieurs avantages par rapport à la microscopie optique conventionnelle à champ large : la réduction des informations en dehors du plan focal, le contrôle de la profondeur de champ et la possibilité de recueillir des coupes optiques en série permettant la reconstruction 3D des images. Cette technique de microscopie a été utilisée pour acquérir les images de cellules uniques étudiées dans les chapitres 2, 3 et de sphéroïdes dans le chapitre 5.

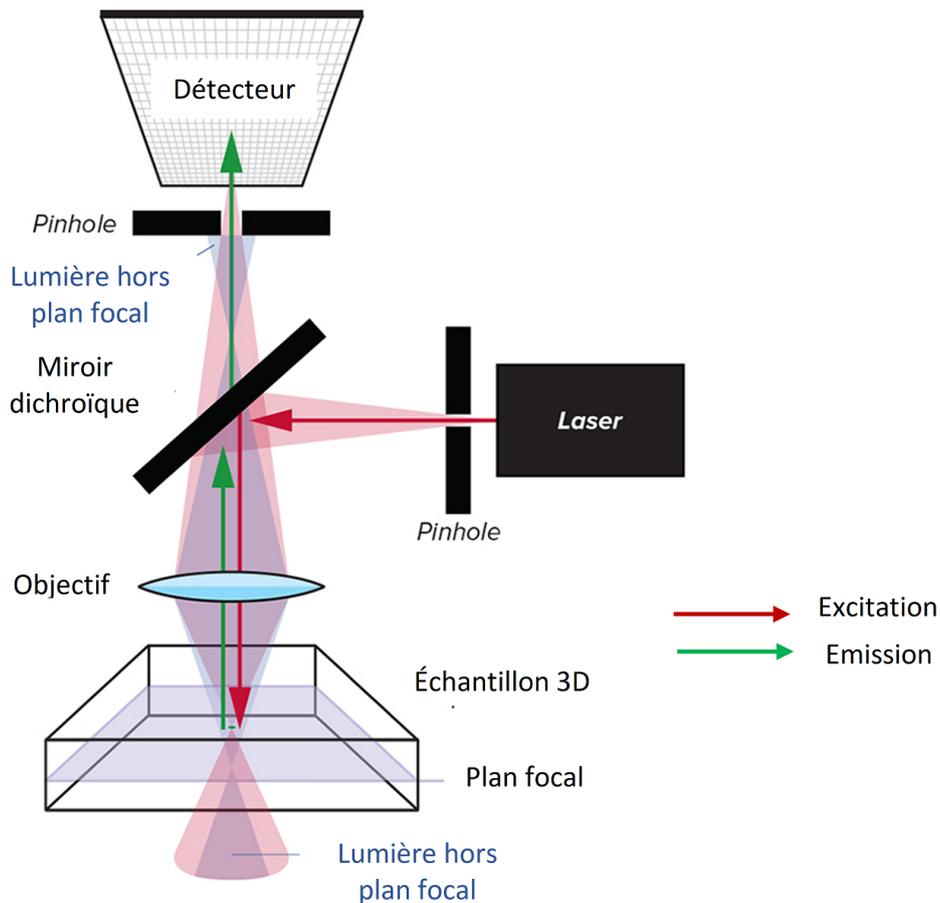


FIGURE 1.8 – Le principe de la microscopie confocale à fluorescence. Excitation de l'échantillon par un système de balayage laser. Une fraction de la fluorescence émise par les fluorophores est collectée par l'objectif du microscope et projetée sur le pinhole de détection. La lumière émise hors du plan focal de l'objectif est largement bloquée par le pinhole devant le détecteur. Les images tridimensionnelles peuvent être construites en empilant les images bidimensionnelles de chaque plan focal. Figure modifiée à partir de <https://www.laser2000.co.uk/>.

1.7.2.2 Microscope à feuillet de lumière

Au cours des dernières décennies, des efforts ont été déployés pour développer des alternatives de microscopie permettant de visualiser des volumes d'échantillons plus rapidement, avec des résolutions spatio-temporelles élevées sur de longues périodes, tout en préservant l'échantillon sous de faibles niveaux d'irradiation. La microscopie de fluorescence à feuillet de lumière (LSFM) s'est avérée être la technique de choix pour atteindre ces objectifs difficiles [121, 122]. Essentiellement, le LSFM consiste à éclairer l'échantillon avec un faisceau laser laminaire, généralement appelé feuille ou nappe de lumière, mais seulement dans la partie de l'échantillon qui est imagée. Ensuite, la fluorescence résultant du plan illuminé est collectée dans une direction perpendiculaire à l'axe d'illumination, comme le montre la figure 1.9. De plus, comme les nappes de lumières n'illuminent qu'un volume laminaire très fin de l'échantillon, l'image projetée sur le réseau de détecteurs 2D correspondra à une section optique propre de l'échantillon, sans lumière hors plan focal. Une telle image est équivalente à celle obtenue avec le microscope confocal à balayage laser, mais sans la nécessité d'une ouverture confocale devant le détecteur (pinhole). Dans un LSFM, les fluorophores situés en dehors du petit volume de la nappe de lumière ne seront pas éclairés et ne subiront donc pas de photo-blanchiment. Ce schéma d'excitation et de collecte des lumières est très efficace et garantit que les fluorophores excités sont exposés à une petite dose de lumière, ce qui entraîne un photo-blanchiment et une photo-toxicité minimales. La nappe de lumière peut être générée de deux manières différentes. La première est basée sur la focalisation de la lumière d'excitation à l'aide d'une lentille cylindrique. La seconde est basée sur le déplacement rapide d'un faisceau occlus au niveau du plan focal de la lentille de détection, formant ainsi une feuille de lumière virtuelle [123]. En raison de ces avantages, le LSFM peut bénéficier de l'intégration microfluidique et a été proposé dans plusieurs applications dans la littérature [47, 124, 125, 126, 127, 128]. Ainsi, elle a été utilisée pour acquérir des images de cellules uniques étudiées dans les chapitres 4 et de sphéroïdes dans le chapitre 5.

1.7.3 Systèmes micro-fluidiques

Dans cette section, nous décrivons premièrement le système d'imagerie à feuillet de lumière couplé à un système microfluidique pour l'imagerie à haut débit de cellules uniques. Ce système a été développé chez nos partenaires dans le cadre du projet PROCHIP, dans le département de physique à Politecnico di Milano, Milan, Italie [29]. Deuxièmement, nous décrivons les systèmes à micro-puits utilisés pour la culture des sphéroïdes.

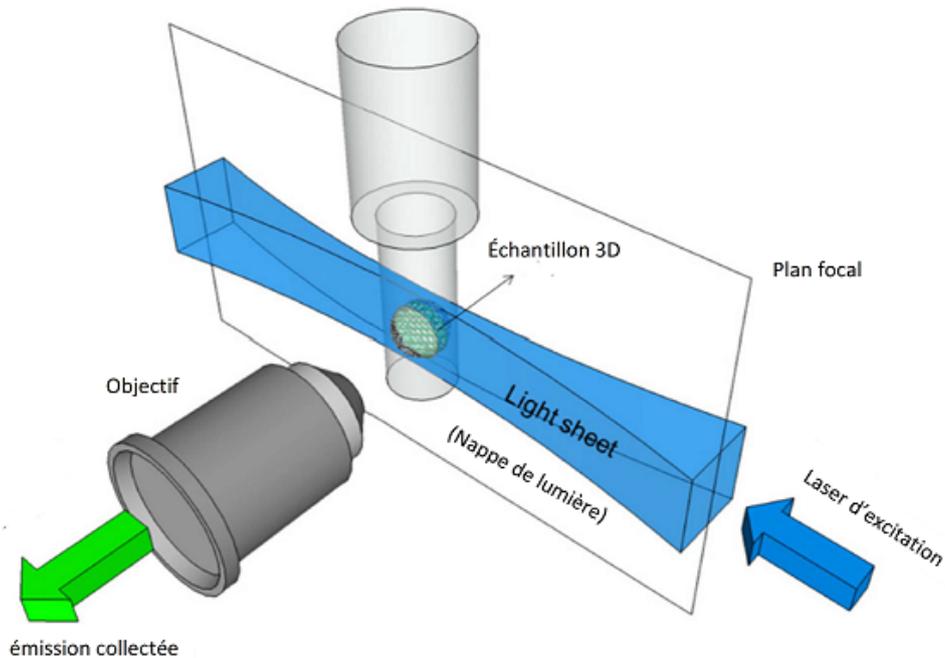


FIGURE 1.9 – Le principe de la microscopie de fluorescence à feuillet de lumière. Figure modifiée à partir de [123].

1.7.3.1 Système microfluidique couplé à un microscope à feuillet de lumière

La configuration microfluidique consiste en un dispositif optofluidique interfacé avec un microscope à champ large standard inversé. La micropuce comprend un réseau fluide tridimensionnel contenant un seul microcanal, utilisé pour délivrer en continu des cellules uniques en suspension dans le champ de vision (FOV, pour *Field Of View*) du microscope, et une lentille cylindrique intégrée qui est utilisée pour générer un plan lumineux à travers le canal, en correspondance avec le plan focal de l'objectif du microscope.

Le réseau microfluidique a un seul microcanal en forme de U, avec une entrée et une sortie connectées au flacon d'échantillon et au système de pompage externe par des tubes biocompatibles en polyéther éther cétone, avec un diamètre interne de $100 \mu\text{m}$ et une longueur de 15 cm . Ce microcanal est conçu avec une section transversale de $\approx 60 \times 90 \mu\text{m}^2$, ce qui garantit le passage des cellules de diamètre variant de 15 à $25 \mu\text{m}$ simultanément. Cette petite section transversale s'adapte bien au champ de vision d'un objectif à haute ouverture numérique (NA) et à grand grossissement. Ce microcanal est relié à la connexion du tube par une entrée conique (voir figure 1.10.C).

Les lasers d'excitation sont couplés au dispositif à l'aide d'une fibre optique mo-

nomode, afin d'être directement connectables aux sources lasers standards et d'éviter le besoin de passer par des couplages externes. L'illumination à feuille de lumière est obtenue par une microlentille cylindrique creuse avec deux surfaces asphériques intégrée dans la micropuce. Cette conception garantit une largeur théorique (obtenue par simulation) de la feuille de lumière de 1.6 et 1.7 μm pour une longueur d'onde d'éclairage de 488 et 561 nm , respectivement. En même temps, la lentille garantit une épaisseur presque uniforme de la feuille de lumière le long de son axe de propagation, avec une largeur à mi-hauteur (FWHM) de 3.2 μm mesuré au bord du FOV, c'est-à-dire à 5 μm des parois du canal, pour les deux longueurs d'ondes. L'épaisseur réelle de la feuille de lumière générée a été caractérisée expérimentalement, en visualisant le signal de fluorescence de la rhodamine. Ces mesures ont permis d'obtenir une largeur minimale FWHM de 2.1 μm mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 532 μm . L'écart entre la valeur théorique et la valeur mesurée pourrait être principalement attribué à quelques déviations mineures du profil de la lentille par rapport au profil théorique et à la présence de rugosité résiduelle due au processus de gravure de la microlentille. Pour définir la résolution latérale du microscope, la lentille a été intégrée au canal microfluidique et plusieurs images de nanobilles fluorescentes d'un diamètre de 100 μm émettant à 650 nm ont été acquises. Cette analyse a permis d'obtenir un FWHM latéral de PSF de 0.51 μm , supérieur à la limite de diffraction théorique de $d = \frac{\lambda}{(2 \times NA)} = 0.295 \mu m$. Cela pourrait être dû, premièrement, aux aberrations sphériques résiduelles introduites par le microcanal, et deuxièmement, aux mouvements des nanobilles pendant l'acquisition, en raison de leur mouvement brownien dans le liquide.

L'ensemble du dispositif a une dimension de $6 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$ peut être monté sur un porte-échantillon personnalisé ayant les mêmes dimensions qu'une lame de verre de microscope, en maintenant l'alignement avec les phases de mouvement externe du microscope à champ large. Dans cette configuration, les cellules sont transportées l'une après l'autre à travers le plan lumineux, réalisant ainsi une acquisition automatique par microscopie de fluorescence à feuille de lumière (LSFM). Un schéma de la configuration et du dispositif est présenté dans la figure 1.10.A-B, ainsi qu'un schéma de microcanal en forme de U est présenté dans la figure 1.10.C-D. En plus, un exemple d'une image de cellule marquée par mCherry (pour visualiser les histones H2B) et par Alexa 488 (pour visualiser l'alpha-tubuline) acquise avec le système développé est présentée dans la figure 1.11.

1.7.3.2 Systèmes à micro-puits pour la culture des sphéroïdes

Les micro-systèmes à base de micro-puits sont parmi les systèmes microfluidiques passifs les plus utilisés pour la culture des sphéroïdes [129]. Le système à micro-puits

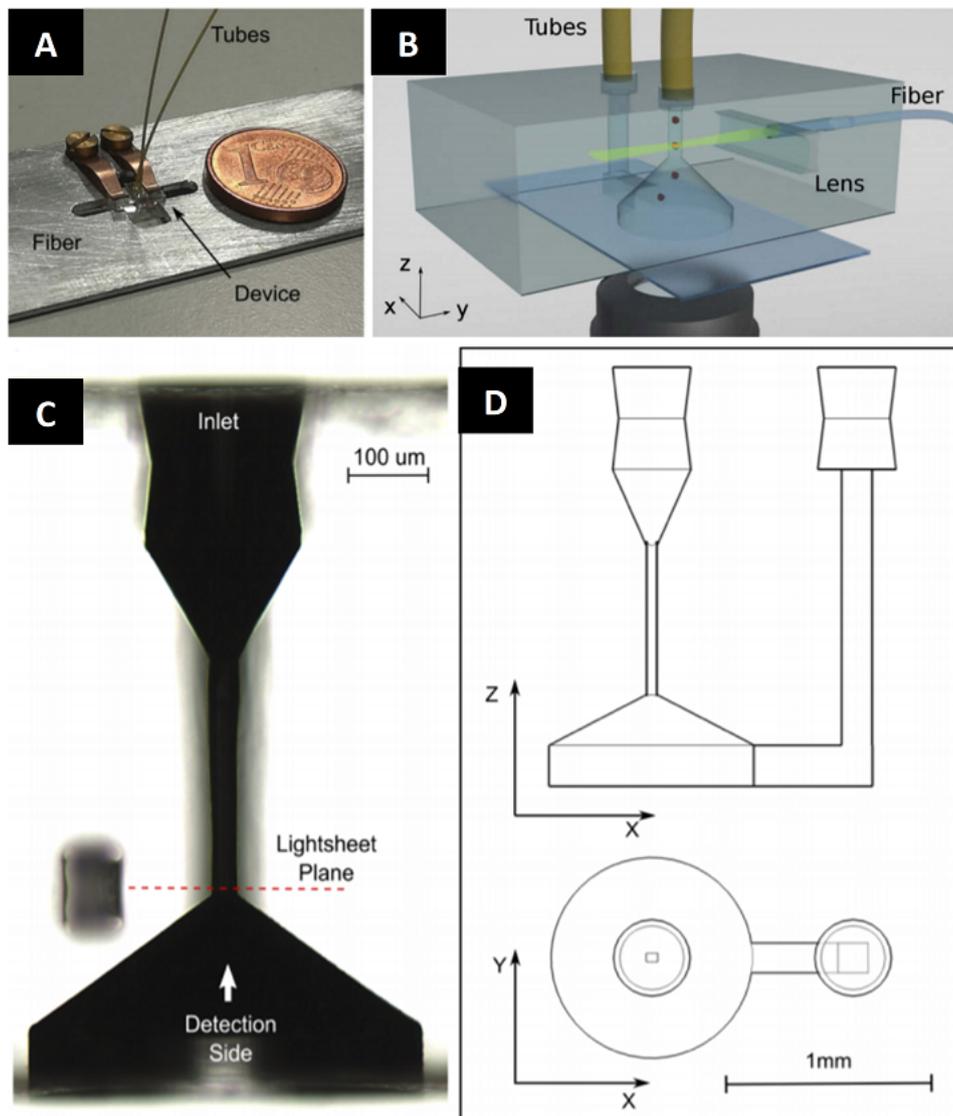


FIGURE 1.10 – Schéma de la configuration et du dispositif microfluidique. (A) Illustration du dispositif monté sur le support personnalisé (en comparaison avec une pièce de 1 centime d’euro). (B) Représentation 3D complète du dispositif. (C) Microcanal de détection avant l’assemblage du dispositif visualisé au microscope. (D) Vues orthogonales du microcanal. Figure modifiée à partir de [29].

est un micro-système à base d’agarose sur des moules en polydiméthylsiloxane (PDMS) constitué d’un réseau de 130 microcylindres (diamètre $200\ \mu\text{m}$, hauteur $200\ \mu\text{m}$). Ils permettent de cultiver les cellules jusqu’à la formation de sphéroïdes cellulaires, de contrôler l’environnement dans lequel les systèmes cellulaires se développent, d’injecter des nutriments, de clarifier et de marquer les sphéroïdes (voir figure 1.12). Ce système a été utilisé pour générer les échantillons de sphéroïdes utilisés dans l’étude des méthodes de clarification et de la clarification numérique à base de l’apprentissage automatique détaillé dans le chapitre 5.

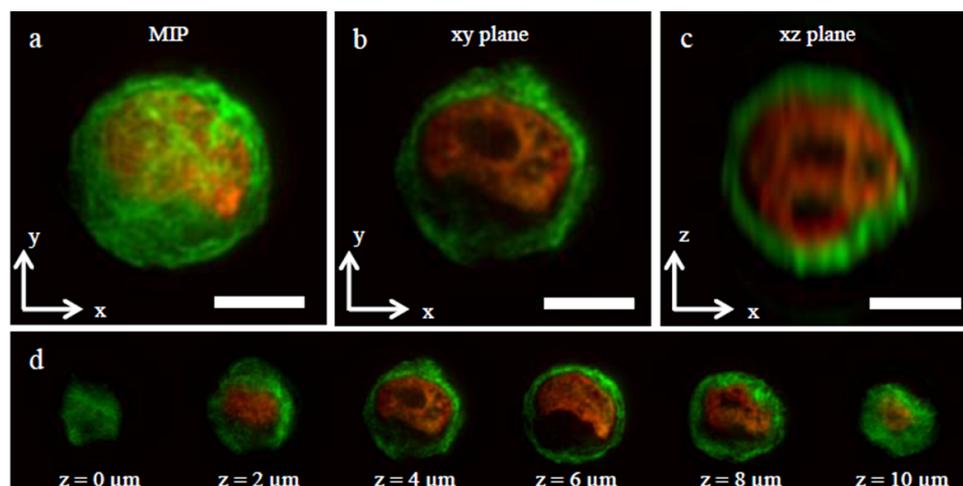


FIGURE 1.11 – Image à double canal d'une cellule unique de type WT. (a) Plan xy calculé par la projection d'intensité maximale (MIP) sur z. (b) Plan xy unique de l'image 3D. (c) Plan xz unique reconstruit. (d) Séquence d'acquisitions du plan xy à différents z pendant le passage de la cellule. Barre d'échelle= 5 μm . Canaux Alexa 488 et mCherry sont représentés en vert et rouge pour visualier l'alpha-tubuline et les histones H2B respectivement. Image reproduite de la base de données du projet PROCHIP.

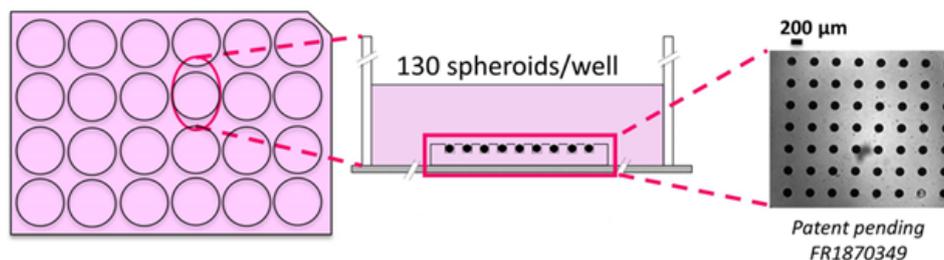


FIGURE 1.12 – Illustration d'un système microfluidique à micro-puits utilisé pour cultiver les sphéroïdes.

1.7.4 Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés dans nos études sont dérivés d'un modèle préclinique de cellules cancéreuses métastatiques du sein [130]. Après transplantation de tIMEC (cellules épithéliales mammaires humaines transformées - WT IMEC- surexprimant MYC et PI3KCA mutant) dans la glande mammaire de souris NGS, les tumeurs primaires formées ont été enlevées chirurgicalement pour isoler les cellules cancéreuses des tumeurs primaires. Les souris traitées ont développé des lésions secondaires à la fois localement (tumeurs secondaires) et dans plusieurs organes (métastases). Lorsque la masse tumorale secondaire s'est développée, les animaux ont été sacrifiés pour retirer chirurgicalement la masse tumorale secondaire et les foyers métastatiques du foie et du poumon. Les masses tumorales et les lésions métastatiques ont été rapidement

désagrégées (en combinant la séparation mécanique et enzymatique) et les cellules cancéreuses ont été isolées en les plaçant dans des milieux de culture définis. En utilisant cette procédure, nous avons obtenu des cellules saine (WT IMEC) et des cellules cancéreuses dérivées de xénogreffes (XD) et des cellules métastatiques (MD). Finalement, les trois types de cellules ont été transférés pour exprimer la protéine fluorescente mCherry (longueur d'onde d'émission centrale $\lambda_{em} = 610 \text{ nm}$) en correspondance avec l'histone H2B, à l'intérieur du noyau [130]. Ces échantillons ont été utilisés dans les études présentées dans les chapitres 2, 3 et 4 de ce mémoire. La description de la préparation des échantillons des sphéroïdes est détaillée dans le chapitre 5.

1.7.5 Les approches de traitement d'images des cellules uniques

Deux grandes familles d'approches sont proposées dans la littérature pour aborder la caractérisation des cellules en microscopie sous-résolue [131, 132] et en microscopie super-résolue [133, 134]. Pour le cas sous-résolu, où les cellules sont déterminées par des motifs globaux plus ou moins organisés, on peut utiliser une approche texturale. Alors que pour le cas super-résolu, les distributions des marqueurs fluorescents sont classiquement étudiées avec une approche pointilliste. Dans cette section, nous décrivons les différents espaces de descripteurs pointillistes et texturaux que nous avons utilisés dans nos travaux pour le tri des différents types de cellules uniques. Nous nous focalisons dans cette section sur les méthodes d'extraction des caractéristiques, tandis que d'autres méthodes de traitement d'images microscopiques, notamment, pour la classification, le débruitage et la segmentation des images basée sur l'apprentissage profond sont détaillées dans les chapitres 3, 4 et 5 respectivement.

1.7.5.1 Caractéristiques pointillistes

Dans une image microscopique super-résolue où les différents marqueurs fluorescents sont localisés individuellement, il est nécessaire de caractériser statistiquement leurs organisations spatiales pour déchiffrer l'hétérogénéité cellulaire. Plusieurs algorithmes ont été développés pour analyser quantitativement l'organisation spatiale et la colocalisation des molécules. Nous pouvons citer par exemple, les coefficients de Manders [135] et les coefficients de corrélation de Spearman [136] pour l'analyse de colocalisation, l'analyse de l'organisation du cluster spatial basé sur la densité (DBSCAN, pour *Density Based Spatial Cluster Analysis with Noise*) [137], l'analyse des motifs spatiaux locaux de Getis et Franklin [138] et l'analyse des clusters basée sur le diagramme de Voronoi [139], etc. Dans ce qui suit, nous décrivons deux types des méthodes que nous avons utilisées pour l'extraction des caractéristiques pointillistes.

Analyse statistique de la distribution des marqueurs

Cette méthode a été appliquée au problème du tri des cellules. Elle est basée sur l'ajustement de la distribution des marqueurs fluorescents avec des modèles de distributions statistiques. Pour ce faire, l'organisation des marqueurs est analysée en calculant la distance entre les marqueurs, la distance des marqueurs à la position moyenne des marqueurs et la distance entre chaque marqueur et son plus proche voisin. À partir de ces distances, un large ensemble de 16 distributions statistiques communes de la littérature a été testé comme proposé dans [140]. Comme compromis entre la qualité de l'ajustement et le nombre de paramètres dans la distribution, la meilleure distribution parmi toutes celles testées a été sélectionnée pour minimiser le critère d'inférence bayésien (*BIC*) [141, 142] exprimé comme suit,

$$BIC = -2\ln(L) + p.\ln(nb) , \quad (1.2)$$

avec L est la vraisemblance du modèle, nb le nombre d'observations dans l'échantillon et p le nombre de paramètres dans le modèle. Dans nos études, nous avons utilisé les paramètres statistiques des modèles sélectionnés pour chaque distance calculée selon *BIC* comme caractéristiques pointillistes pour le tri des cellules. Pour illustration, la figure 1.13 montre un exemple de deux distributions des marqueurs pour deux classes des cellules simulées. Les distributions des distances sont ajustées avec des distributions statistiques et elles sont trouvées comme suit, Rayleigh $R(0, \text{scale } \sigma_R)$ pour la distance entre les marqueurs, exponentiel $\exp(0, \text{rate } \lambda_E)$ pour la distance à la moyenne et valeur extrême généralisée $GEV(\text{shape } \xi_G, \text{scale } \sigma_G, \text{mean } \mu_G)$ pour la distance des marqueurs au plus proche voisin. Les cinq paramètres statistiques ($\sigma_R, \lambda_E, \xi_G, \sigma_G, \mu_G$) des distributions de distance seront utilisées comme caractéristiques pour la classification des cellules.

Analyse des motifs spatiaux : Fonction K de Ripley

La fonction K de Ripley est classiquement utilisée en microscopie [143, 144, 145] pour résumer globalement le caractère aléatoire spatial ou le comportement de regroupement des marqueurs fluorescents et estimer les paramètres d'organisation des marqueurs. Cependant, dans notre travail, nous avons utilisé cette fonction comme un descripteur pour le tri des cellules. Par définition, la fonction K de Ripley est une analyse spatiale permettant de décrire la manière dont les motifs ponctuels se produisent sur une zone d'intérêt donnée (cercle de rayon r) et dont l'expression standard est la suivante,

$$K(r, n) = \frac{|\Omega|}{n(n-1)} \sum_{x \neq y} L_{\{|x-y| \leq r\}} f(x, y) , \quad (1.3)$$

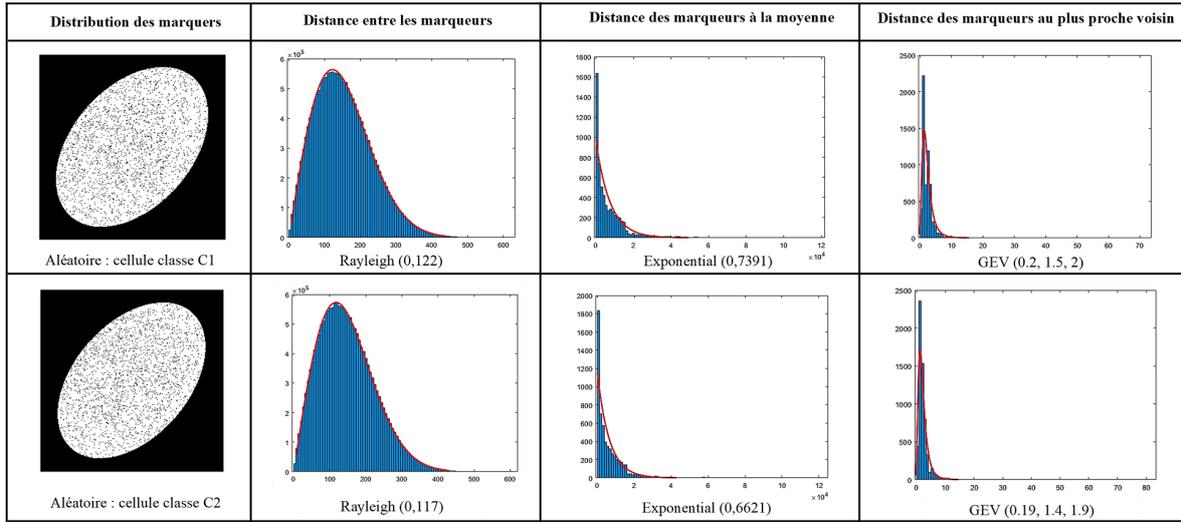


FIGURE 1.13 – Ajustement des distances avec des distributions sélectionnées à partir du critère BIC parmi un large ensemble de distributions communes comme dans [142]. Le bleu représente l'histogramme et le rouge l'ajustement. La première ligne pour une cellule de classe (C_1) et la deuxième pour une cellule de classe (C_2).

où n est le nombre total d'événements dans le champ de vision donné $|\Omega|$, $L_{\{|x-y|\leq r\}}$ est une fonction indicatrice égale à 1 si la distance entre les marqueurs situés en x et y est inférieure au rayon r , et égale à 0 sinon. $f(x, y)$ est un terme de correction de bords qui empêche un biais dans $K(r, n)$ à de grandes valeurs de r dû à la taille finie de $|\Omega|$. En effet, certaines paires de marqueurs séparés d'une distance inférieure à r peuvent tomber en dehors de la fenêtre d'observation $|\Omega|$, conduisant à une sous-estimation de K . De multiples méthodes de correction des bords ont été conçues pour la fonction K de Ripley. La correction des bords la plus utilisée est la correction de Ripley exprimée comme suit,

$$f(x, y) = \frac{1}{2}(P(x, y) + P(y, x)) , \quad (1.4)$$

où,

$$P(x, y) = \frac{|\partial b(x, |x-y|)|}{|\partial b(x, |x-y|) \cap \Omega|} . \quad (1.5)$$

Elle consiste à diviser le nombre d'événements à une certaine distance de l'événement central par la proportion de la circonférence d'un cercle $\partial b(x, |x-y|)$ qui est incluse dans le champ de vision $|\Omega|$ [146]. Un problème avec la fonction K de Ripley originale est qu'elle n'est pas centrée et normalisée, ce qui complique son interprétation quantitative. Dans notre travail, nous avons utilisé la version d'estimation proposée par [147] donnée comme,

$$\hat{K}(r, n) = \sqrt{\frac{K(r, n)}{\pi}} - r . \quad (1.6)$$

Ainsi l'allure de cette fonction \hat{K} définit le type de distribution des marqueurs. Par exemple, si $\hat{K} \approx 0$ la distribution est complètement aléatoire ou uniforme, si $\hat{K} < 0$ la distribution est dispersée et si $\hat{K} > 0$ alors les marqueurs sont distribués en cluster comme montré dans la figure 1.14.

Dans nos études, nous avons extrait à partir des courbes \hat{K} , cinq caractéristiques : la valeur maximale de \hat{K} , le gradient maximal $[0, max]$, le gradient minimal $[max, end]$, le rayon correspondant à la valeur maximale de \hat{K} et la corrélation de Spearman entre \hat{K} et le rayon r de manière similaire à ce qui a été proposé dans [145].

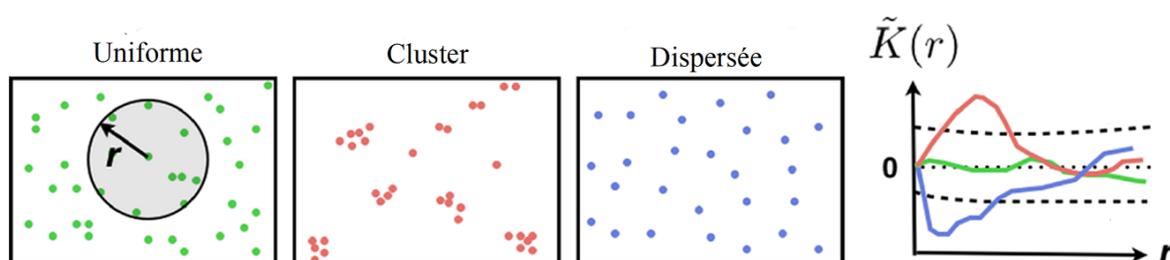


FIGURE 1.14 – Allure de la fonction \hat{k} de Ripley selon le type de la distribution spatiale des marqueurs. Pour une distribution uniforme $\hat{K} \approx 0$, en cluster $\hat{K} > 0$ et dispersée $\hat{K} < 0$. Figure modifiée à partir de [146].

1.7.5.2 Caractéristiques texturales 2D et 3D

Les méthodes texturales sont largement utilisées en apprentissage automatique pour la représentation des motifs texturaux dans une image microscopique en 2D ou 3D. Nous avons utilisé ces méthodes pour trier les cellules uniques. Il existe un grand nombre de méthodes [148] et il n'y a pas de preuve d'optimalité pour aucun outil. Nous n'avons pas l'intention d'être exhaustifs et nous avons fait une sélection des méthodes classiques.

Fonction d'auto-corrélation des images 2D

Un outil standard pour caractériser les statistiques de second ordre d'une texture consiste à analyser la transformée de Fourier spatiale de l'auto-corrélation d'une image. Cet outil a été utilisé, par exemple, pour caractériser l'arrangement des marqueurs fluorescents en microscopie [149, 150]. Par définition, l'auto-corrélation consiste à comparer toutes les paires de pixels possibles et à indiquer la probabilité que les deux soient brillants en fonction de la distance et de la direction de séparation. Mathématiquement, l'auto-corrélation est la convolution d'une fonction avec elle-même. Pour une image

microscopique I de taille $M \times N$, la fonction d'auto-corrélation $G(a, b)$ est calculée par l'équation suivante,

$$G(a, b) = \sum_x^M \sum_y^N i(x, y) * i(x - a, y - b) , \quad (1.7)$$

avec $i(x, y)$ est l'intensité de l'image à la position (x, y) et a et b représentent le décalage par rapport à la position initiale x et y . En pratique, les auto-corrélations sont calculées plus efficacement et plus rapidement par des transformées de Fourier rapides en utilisant le théorème de Wiener-Khinchin. Ce théorème indique que la densité du spectre de puissance d'une image est égale à la transformée de Fourier (F) de l'auto-corrélation de cette image. Dans notre étude, l'équation utilisée pour calculer l'auto-corrélation d'une image est sous la forme suivante,

$$G(i) = F^{-1}[PS(i)] , \quad (1.8)$$

où $PS(i) = |F[i(x, y)]|^2$ est le spectre de puissance de l'image. La forme de l'auto-corrélation peut être résumée par diverses caractéristiques. Dans nos travaux, nous proposons de calculer cinq caractéristiques pour les tâches de classification : la valeur d'auto-corrélation maximale, la largeur à mi-hauteur (FWHM), le gradient maximal et minimal et la variance de la partie restante du profil des fonctions d'auto-corrélation après suppression des pics centraux.

Matrice de co-occurrence des niveaux de gris (GLCM) 2D et 3D

Une autre approche statistique classique qui peut bien décrire les statistiques de second ordre d'une image de texture est fournie par la matrice de co-occurrence des niveaux de gris (GLCM, pour *Gray Level Co-occurrence Matrix*). La GLCM a été introduite pour la première fois par [151] et est essentiellement un histogramme bidimensionnel dans lequel le (i, j) ème élément est la fréquence de co-occurrence de l'intensité du pixel i avec l'intensité du pixel j . Elle est d'une dimension de $b \times b$, où b représente le nombre de niveaux de gris dans une image et est spécifiée par les fréquences relatives $C(i, j, d_{xy}, \theta)$ dans lesquelles deux pixels, séparés par une distance d_{xy} , se produisent dans une direction spécifiée par l'angle θ , l'un avec un niveau de gris i et l'autre avec un niveau de gris j (voir figure 1.15). Habituellement, la GLCM est calculée pour quatre directions ou orientations principales sont $\theta=(0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ et $135^\circ)$. Pour caractériser les textures dans une image, un ensemble de 14 coefficients de Haralick résumant la GLCM est ensuite calculé. Dans l'annexe A, nous présentons les caractéristiques d'Haralick que nous avons utilisées par la suite dans cette thèse pour la classification des cellules.

Le concept de GLCM est également adapté à la 3D pour étudier les textures dans les

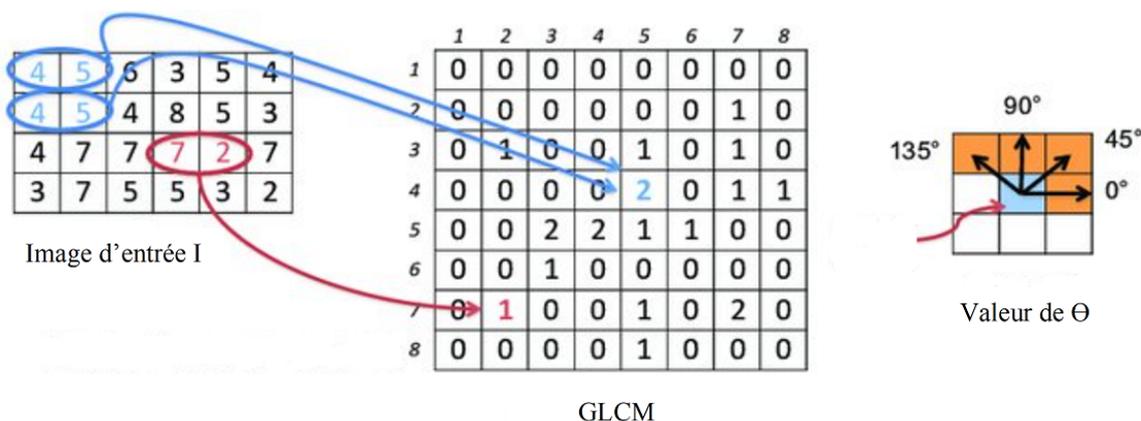


FIGURE 1.15 – Principe du calcul de la matrice de co-coccurrence des niveaux de gris. Figure reproduite à partir de [152].

images volumétriques [153]. En 3D, la GLCM est définie en spécifiant une distance inter-voxels $d = (d_x, d_y, d_z)$. En plus, nous n'utilisons plus seulement quatre directions comme en 2D, mais plutôt 13 directions qui sont définies par le pair (θ, Φ) avec θ l'angle dans le plan XY et Φ dans le plan de Z. Ces 13 directions sont : $(0^\circ, 0^\circ)$, $(45^\circ, 0^\circ)$, $(90^\circ, 0^\circ)$, $(135^\circ, 0^\circ)$, $(0^\circ, 45^\circ)$, $(0^\circ, 90^\circ)$, $(0^\circ, 135^\circ)$, $(90^\circ, 45^\circ)$, $(90^\circ, 135^\circ)$, $(45^\circ, 45^\circ)$, $(45^\circ, 135^\circ)$, $(135^\circ, 45^\circ)$ et $(135^\circ, 135^\circ)$.

Motifs binaires locaux (LBP et LBP-TOP)

Les motifs binaires locaux (LBP, pour *Local Binary Pattern*) sont également parmi les descripteurs texturaux les plus utilisés dans les tâches de classification [154]. Pour chaque coordonnée du pixel central (x, y) de l'image, les motifs binaires locaux (LBP) indique un ensemble séquentiel résultant de la comparaison binaire de sa valeur avec les P voisins dans un cercle de rayon R autour du pixel central de coordonnée (x, y) . Ainsi, le LBP attribue à chaque voisin la valeur 0 ou 1, si sa valeur est plus petite ou plus grande que le pixel placé au centre, respectivement. La valeur décimale résultante du nombre binaire généré remplace la valeur du pixel central et peut être exprimée comme suit,

$$LBP(x, y) = \sum_{n=0}^{P-1} 2^n B(i_n - i_{(x,y)}), \quad (1.9)$$

où $i_{(x,y)}$ est la valeur d'intensité du pixel central et i_n désigne la valeur d'intensité du $n^{\text{ième}}$ pixel voisin. En outre, la fonction $B(s)$ est définie comme suit,

$$B(s) = \begin{cases} 1, & \text{if } z \geq 0 \\ 0, & \text{if } z < 0. \end{cases} \quad (1.10)$$

La fréquence des occurrences de chaque code décimal est ensuite calculée et utilisée comme descripteur de texture (voir figure 1.16).

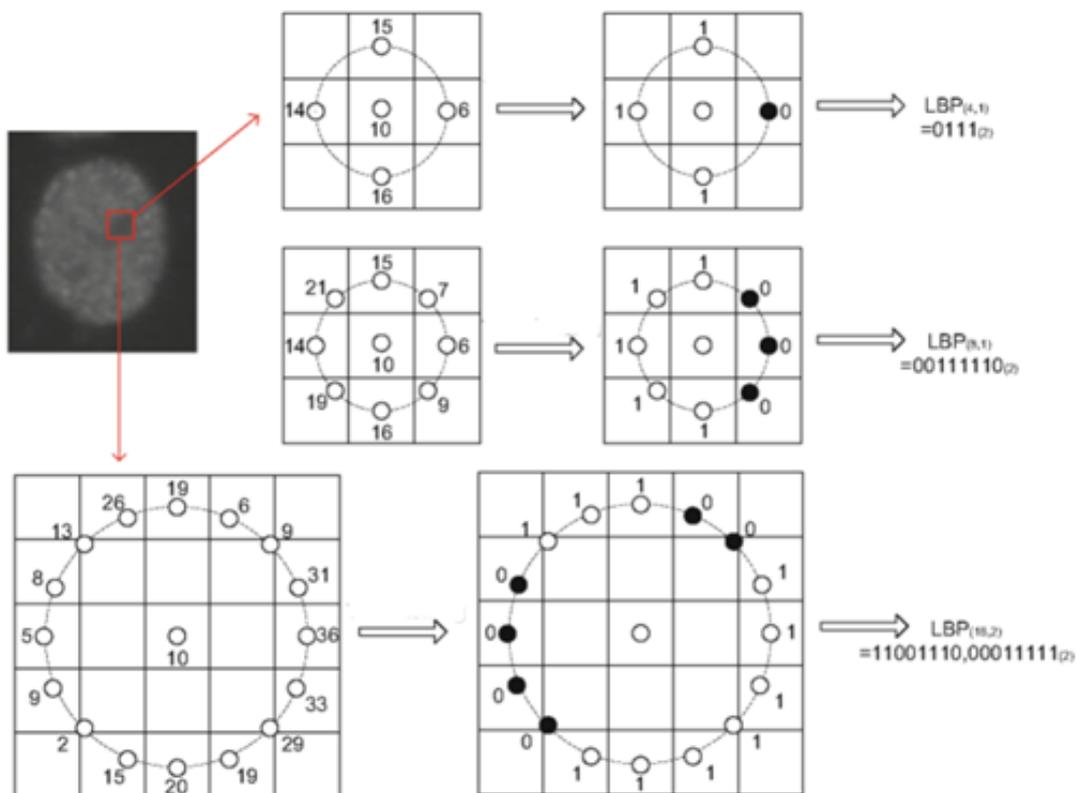


FIGURE 1.16 – Principe d'extraction des caractéristiques texturales LBP d'une image 2D avec les paires de voisinage et de rayon : $(P = 4, R = 1)$, $(P = 8, R = 1)$ et $(P = 16, R = 2)$ et les codes décimaux résultants. Figure reproduite à partir de [155].

Une extension de LBP, appelée le LBP-TOP [156] est appliquée sur les volumes des images 3D. A la base, cette méthode a été développée pour l'extraction de caractéristiques dynamiques dans les vidéos. Cette méthode ne prend en compte que les statistiques de co-occurrences dans trois plans XY, XZ et YZ qui s'intersectent dans le pixel central. LBP-TOP considère les distributions de caractéristiques de chaque plan séparément, puis les concatène ensemble dans un seul histogramme rendant le vecteur de caractéristiques beaucoup plus court lorsque le nombre de points voisins

augmente par comparaison avec une autre variante de LBP comme le LBP volumétrique (VLBP) [157]. Figure 1.17 montre le processus d'extraction des caractéristiques des trois plans orthogonaux pour un bloc volumétrique et leur concaténation dans un histogramme. L'histogramme des caractéristiques de LBP-TOP peut être défini comme suit,

$$H_{i,j} = \sum_{x,y,z} I\{f_j(x,y,z) = i\}, \quad i = 0, \dots, n_j - 1; j = 0, 1, 2, \quad (1.11)$$

où, n_j est le nombre des différents codes produits par l'opérateur LBP dans le $j^{\text{ème}}$ plan ($j = 0 : XY, 1 : XZ$ and $2 : YZ$), $f_i(x,y,z)$ désigne le code LBP du pixel central (x,y,z) dans le $j^{\text{ème}}$ plan, $x \in \{0, \dots, X - 1\}$, $y \in \{0, \dots, Y - 1\}$, $z \in \{0, \dots, Z - 1\}$ et $I\{A\}$ définie comme montré ci-dessous,

$$I\{A\} = \begin{cases} 1, & \text{if } A \text{ is true,} \\ 0, & \text{if } A \text{ is false.} \end{cases} \quad (1.12)$$

Ensuite, l'histogramme calculé sera normalisé pour obtenir une description cohérente selon l'équation suivante :

$$N_{i,j} = \frac{H_{i,j}}{\sum_{k=0}^{n_j-1} H_{kj}}. \quad (1.13)$$

Nous désignons les paramètres de LBP-TOP par $LBP-TOP_{PXY, PXZ, PYZ, RX, RY, RZ}$ où les paramètres P indiquent la taille du voisinage pour chacun des trois plans orthogonaux, tandis que les paramètres R indiquent les rayons le long des dimensions X, Y et Z du descripteur.

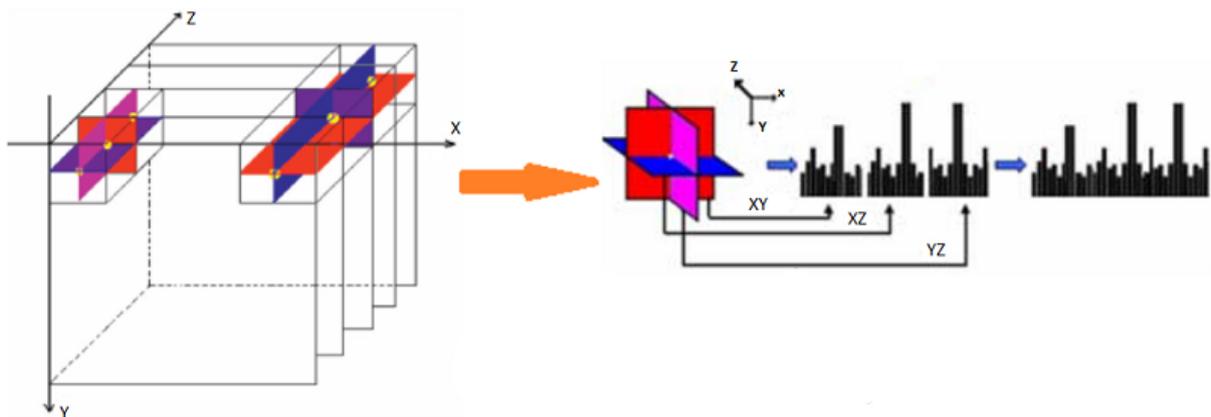


FIGURE 1.17 – Extraction des caractéristiques LBP-TOP pour chaque bloc 3D. Les caractéristiques sont extraites de trois plans orthogonaux (XY, YZ and XZ) pour un bloc, puis concaténées ensemble pour formée un histogramme. Figure reproduite à partir de [156].

Transformée en scattering (scattering transform)

La transformée en scattering a été introduite par [158]. Elle définit une représentation du signal qui est invariante aux translations et potentiellement à d'autres groupes de transformations comme les rotations ou les changements d'échelle. Elle est également invariante aux déformations et est donc bien adaptée à la classification des images et des signaux [159, 160, 161]. Une transformée en scattering est implémentée avec une architecture de réseau convolutionnel, itérant sur la décomposition en ondelettes et le module complexe, et, dans un certain sens, imite les réseaux neuronaux convolutifs en cascasant plusieurs couches de filtrage. Dans ce chapitre, nous allons donner une description succincte de la représentation de la transformée en scattering d'une image. Davantage de détails peuvent être trouvés dans [158, 160]. La figure 1.18 montre un réseau de transformation par diffusion de trois couches fonctionnant comme un extracteur de caractéristiques. Les vecteurs de diffusion Z_m à la sortie des trois premières

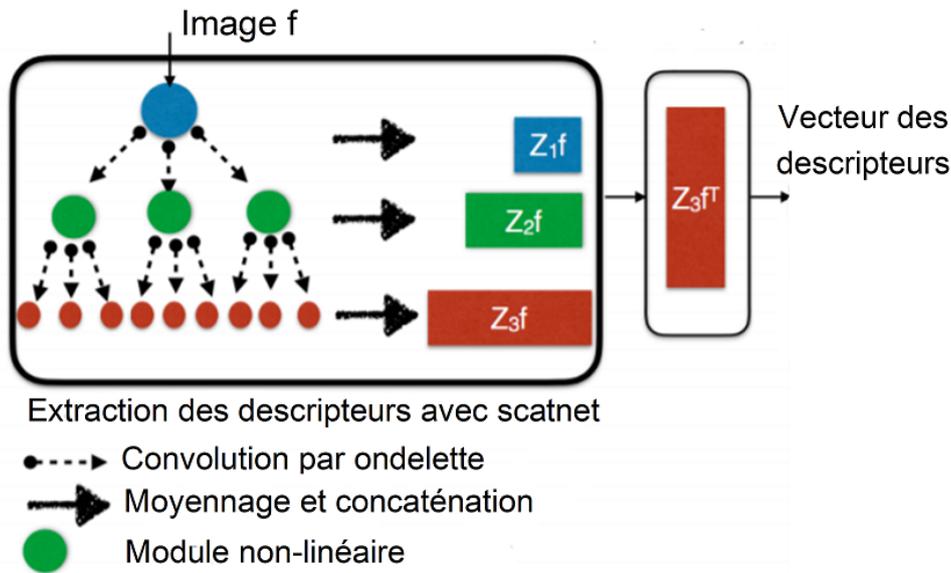


FIGURE 1.18 – Schéma de l'extraction de caractéristiques par un réseau de transformation de diffusion (scatnet) de trois couches. Figure modifiée à partir de [161].

couches $m = 1, 2, 3$ pour une image d'entrée f sont définis par,

$$\begin{aligned}
 Z_1 f &= \{|f| * \phi\} \\
 Z_2 f &= \{\dots, |f * \psi_{j,\theta}| * \phi, \dots\} \\
 Z_3 f &= \{\dots, \|f * \psi_{j,\theta} | \psi_{k,\phi} | * \phi, \dots\},
 \end{aligned} \tag{1.14}$$

où le symbole $*$ désigne la convolution spatiale, $|\cdot|$ représente la norme L_1 , ϕ est un opérateur de moyennage, $\psi_{j,\theta}$ est une ondelette dilatée de 2^j et d'orientation θ . La

gamme d'échelles est $j = \{1, \dots, J\}$ et le nombre d'orientations $\theta = \{0, \pi/L, \dots, \pi(L-1)/L\}$ sont définis par les entiers J et L . Finalement, le nombre de couches est compris entre $m = 1$ et $m = M$. Pour la classification des images microscopiques, nous avons utilisé le filtre de Gabor comme l'ondelette mère. La version 3D de la transformée en scattering pourra être estimée à partir des trois plans orthogonaux XY, XZ and YZ calculés comme la projection de somme sur z des images 3D. Une visualisation des images à la sortie du réseau de la transformée en scattering est présentée dans la figure 1.19.

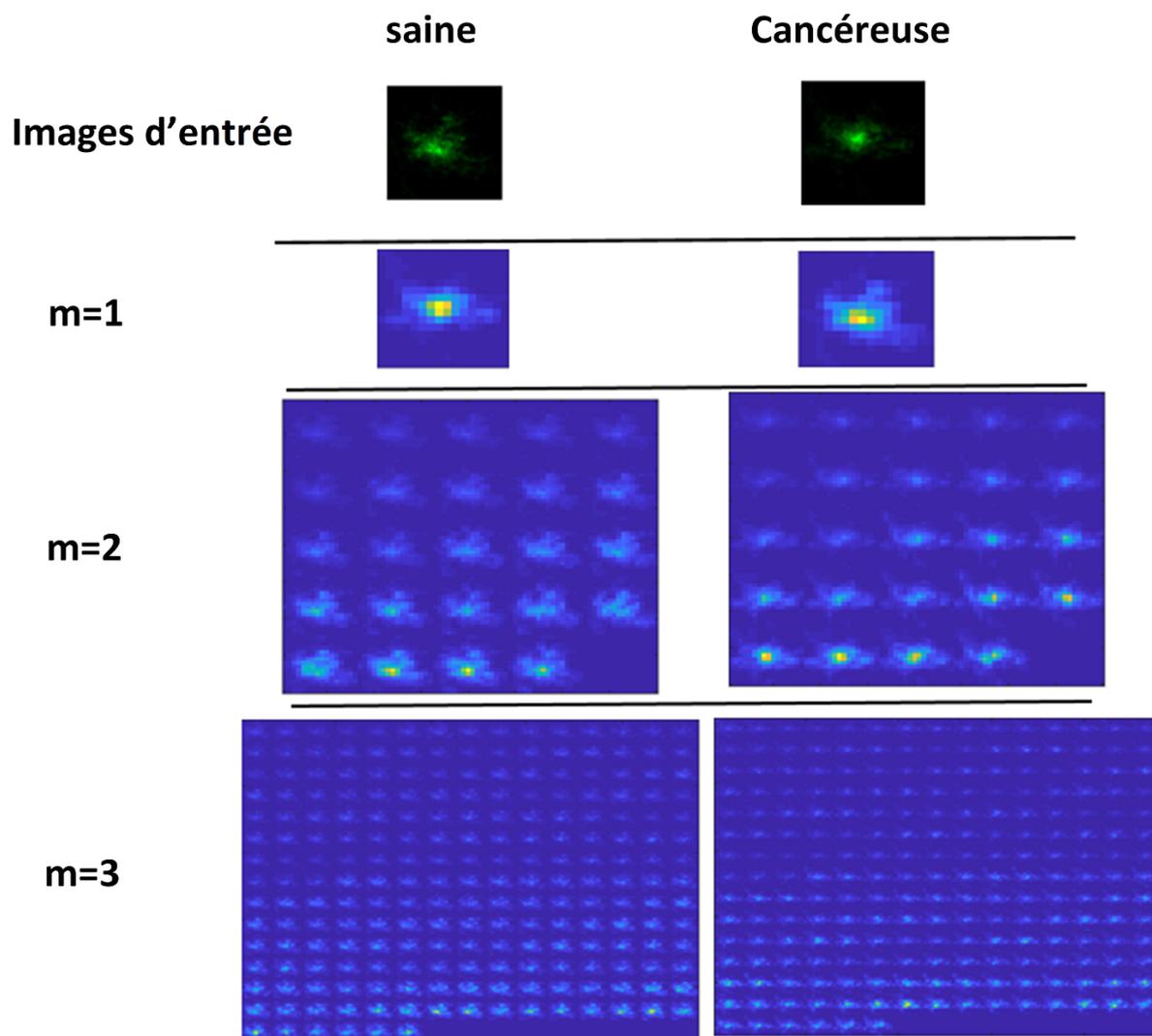


FIGURE 1.19 – Images de sortie du réseau de la transformée en scattering à trois couches ($m = 3$, $j = 4$ d'échelle et $L = 6$ d'orientations de filtre) pour un exemple d'image de cellule saine et cancéreuse.

1.7.6 Les algorithmes en apprentissage machines

Dans cette section, nous présentons les deux principaux algorithmes d'apprentissage automatique supervisé que nous avons utilisés dans les chapitres suivants pour la classification, le débruitage ou la segmentation d'images de cellules. Le principe de chacun de ces algorithmes est détaillé dans ce qui suit.

1.7.6.1 *Machine à vecteurs de support (SVMs)*

Une machine à vecteurs de support (SVMs, *pour Support Vector Machines*) est un algorithme d'apprentissage automatique supervisé qui peut être utilisé à des fins de classification et de régression. Les SVM sont plus généralement utilisés dans les situations de classification. Les SVMs sont connus pour leurs solides garanties théoriques, leur grande flexibilité ainsi que leur simplicité d'utilisation [162].

Les SVM reposent sur l'idée de trouver un hyperplan qui divise au mieux un jeu de données en deux classes, comme le montre la figure 1.20.A. ils ont pour but de séparer les données en classes à l'aide d'une frontière aussi simple que possible, de telle façon que la distance entre les différents groupes de données et la frontière qui les sépare soit maximale. Cette distance est aussi appelée marge et les SVMs sont ainsi qualifiés de séparateurs à vaste marge, les vecteurs de support étant les données les plus proches de la frontière.

Cette notion de frontière suppose que les données soient linéairement séparables, ce qui est rarement le cas. Pour y pallier, les SVMs reposent souvent sur l'utilisation de noyaux. Ces fonctions mathématiques permettent de séparer les données en les projetant dans un espace vectoriel de plus grande dimension (voir figure 1.20.B). La technique de maximisation de marge permet, quant à elle, de garantir une meilleure robustesse face au bruit et donc un modèle plus généralisable [163].

1.7.6.2 *Réseau de neurones convolutif (CNN)*

Les réseaux de neurones convolutifs (CNN, *pour Convolutional Neural Network*) [164, 165] sont des algorithmes d'apprentissage profond, qui sont particulièrement utiles pour trouver des patterns dans des images afin de reconnaître des objets, des visages et des scènes. La structure d'un CNN consiste en une succession de couches : une couche d'entrée (l'image à l'entrée du réseau), une couche de sortie (décision du réseau) et une couche cachée composée de nombreuses couches convolutives, des couches de correction (fonction d'activation), couches de pooling et couches entièrement connectées (*fully connected ou dense layer*) (voir figure 1.21). La description des composantes d'une

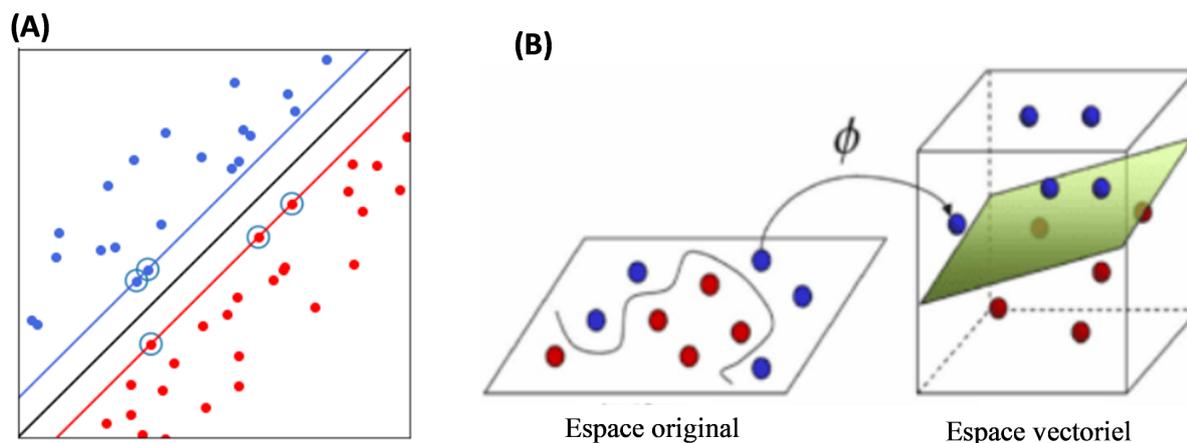


FIGURE 1.20 – Principe de Machine à vecteurs de support (SVMs). (A) Dans cet espace à deux dimensions, la « frontière » est la droite noire, les « vecteurs de support » sont les points entourés (les plus proche de la frontière) et la « marge » est la distance entre la frontière et les droites bleue et rouge. (B) Les SVMs permettent de projeter les données dans une espace de plus grande dimension via une fonction noyau pour les séparer linéairement.

architecture de CNN est la suivante :

- **La couche convolutive** : est le composant clé des réseaux de neurones convolutifs. Elle est utilisée pour extraire un ensemble de caractéristiques (*features*) dans les images reçues à l'entrée du CNN par une opération de filtrage. A la sortie de cette couche, une carte d'activation est générée indiquant où se situent les pixels ayant les descripteurs les plus discriminants. Contrairement aux méthodes traditionnelles, les poids des filtres ne sont pas pré-définies selon un formalisme particulier, mais apprises par le réseau lors la phase d'entraînement. Ces poids sont initialisés aléatoirement puis ils sont optimisés par rétropropagation du gradient.
- **La fonction d'activation** : c'est une fonction non-linéaire appliquée aux cartes d'activation en sortie de la couche de convolution. En rendant les données non-linéaires, elle facilite l'extraction des caractéristiques complexes.
- **La couche de pooling** : L'opération de pooling consiste à réduire la taille des images, tout en conservant leurs caractéristiques importantes. Elle réduit le nombre de paramètres et de calculs dans le réseau. Cela améliore l'efficacité et évite le sur-apprentissage du réseau. Par ailleurs, cette couche de pooling permet l'extraction des contextes à différentes échelles.

- **La couche entièrement connectées (FC)** : c'est un ensemble des neurones qui reçoit un vecteur en entrée contenant les pixels des images aplaties, corrigées et réduites par le pooling. Les poids de cette couche (FC) sont ajustés de la même manière que les poids des filtres de la couche de convolution : lors de la phase d'entraînement, par rétropropagation du gradient.
- **La fonction de coût (*loss function*)** : elle spécifie comment l'entraînement du réseau pénalise l'écart entre la prédiction et les valeurs actuelles. Diverses fonctions de coût adaptées à différentes tâches peuvent y être utilisées.
- **Le taux d'apprentissage (*learning rate*)** : est un hyperparamètre qui contrôle l'ajustement des poids durant l'apprentissage. Un taux d'apprentissage trop élevé peut entraîner des processus d'apprentissage instables ou l'apprentissage d'un ensemble de poids sous-optimaux. Par contre, un taux d'apprentissage trop faible peut entraîner un processus d'apprentissage du modèle très long.

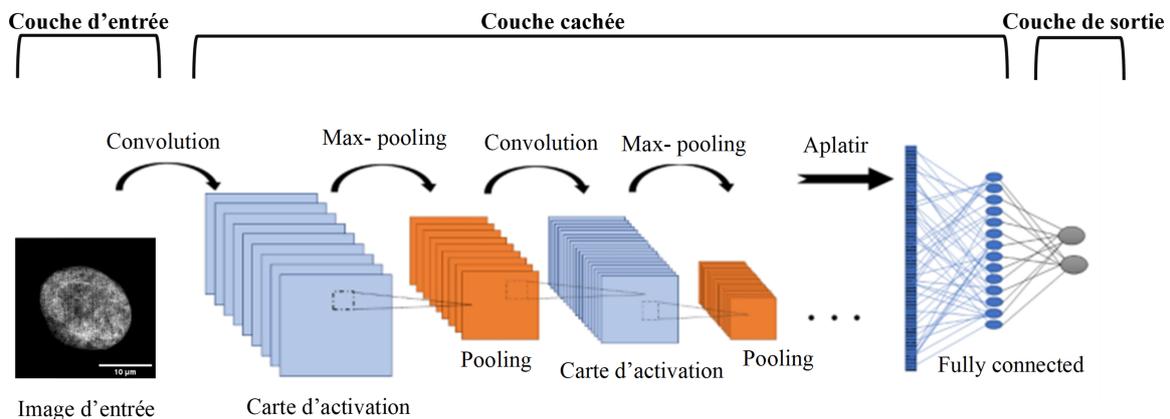


FIGURE 1.21
Architecture basique d'un réseau de neurones convolutif (CNN).

1.8 Conclusion et organisation du document

Dans ce premier chapitre introductif, nous avons vu les différents enjeux et défis pour l'analyse de l'hétérogénéité cellulaire à l'échelle de la cellule unique. Ces enjeux sont dépendants de plusieurs facteurs : la préparation des échantillons dans le cas des sphéroïdes, le système microfluidique, la technique de microscopie et les méthodes de traitement d'images ciblées. La problématique scientifique se résume par l'identification de la méthodologie à utiliser pour définir un compromis entre les coûts des expérimentations et la performance de l'analyse visée. Nous proposons de déterminer ce compromis en utilisant la simulation numérique. Nous avons également décrit dans ce chapitre l'objectif applicatif de cette thèse qui est l'analyse cellulaire pour le tri des cellules cancéreuses. Également, nous avons défini les différents termes et techniques qui seront utilisées pour répondre aux questions des problématiques identifiées (sur cellule unique et agrégats cellulaires). Dans les chapitres suivants, nous présentons les différentes études menées dans la thèse qui sont organisées comme suit :

- **Chapitre 2** présente une première étude pour définir la configuration optique et les méthodes de traitement d'images optimales associées pour une tâche de tri des cellules. Nous faisons une comparaison des microscopies sous et super résolues ainsi que des caractéristiques pointillistes et texturales. Nous proposons également une première version du simulateur d'image microscopique 2D utilisée pour l'instrumentation virtuelle.
- **Chapitre 3** présente une étude pour identifier quelle dimension (2D ou 3D) des images et quel type d'imagerie (conventionnelle ou sans lentille) est nécessaire pour le tri des cellules avec un microscope confocal. Nous proposons une deuxième version du simulateur, plus réaliste pour la génération des images synthétiques.
- **Chapitre 4** présente une étude pour le tri des cellules à haut débit en optimisant les configurations du système microfluidique couplé avec un microscope à fluorescence à feuillet de lumière. Une nouvelle version du simulateur est développée incluant les artefacts microfluidiques. Ce simulateur est utilisé pour l'instrumentation virtuelle et l'augmentation des données.
- **Chapitre 5** présente une étude pour la comparaison entre les méthodes de clarification des sphéroïdes. Des études sur la faisabilité de transfert de connaissance, entre les méthodes de clarification et la clarification numérique basée sur l'apprentissage profond, sont présentées.

Une annexe située après un court chapitre de "conclusion et perspectives" présente la plateforme open source de simulation spécialement développée durant cette thèse

pour permettre à la communauté internationale de bénéficier des résultats obtenus durant cette thèse.

Classification d'images de cellules uniques

Sommaire du présent chapitre

2.1 Introduction	40
2.2 Simulation d'images de microscopie à fluorescence de cellules uniques	43
2.3 Donnée réelles	45
2.4 Localisation des marqueurs fluorescents	46
2.5 Traitement des images	48
2.5.1 Extraction des caractéristiques	48
2.5.2 Classification	50
2.6 Résultats de la classification	51
2.6.1 Cas de différences de densité des marqueurs	51
2.6.2 Cas de différences d'organisation spatiale des marqueurs .	52
2.6.3 Test sur données réelles	52
2.7 Conclusion	55

2.1 Introduction

Ce chapitre présente l'étude publiée dans [166] pour déterminer le compromis entre la technique de microscopie, sous ou super résolue, et le type des caractéristiques d'apprentissage automatique, pointillistes ou texturales, permettant de donner la meilleure performance de tri des cellules. Nous présentons une première version du simulateur développé dans le cadre de cette thèse. Dans cette étude, nous avons utilisé la simulation numérique pour tester différentes approches de microscopie simulée ainsi des images microscopiques réelles.

Nous considérons des images de cellules uniques observées au microscope dans lesquelles des marqueurs fluorescents ont été activés (voir figure 2.1). Nous considérons des tâches qui consistent à détecter des différences dans l'organisation spatiale de ces marqueurs fluorescents. Ces différences peuvent être soit en termes de densité, soit en termes de regroupement (distribution) des marqueurs fluorescents. La tâche de détection des changements d'organisation spatiale des marqueurs est une question importante dans de nombreux contextes biologiques. Par exemple, des états épi-génétiques distincts sont associés à des modifications spatiales et de compactages spécifiques de la chromatine [167, 168]. Par conséquent, la définition de l'organisation 3D des domaines chromatinien associés au cancer pourrait représenter une nouvelle frontière pour déchiffrer l'hétérogénéité tumorale pendant la progression de la tumeur et la formation de métastases [167, 168, 169]. Dans un autre cas, la détection des changements dans la distribution des nucléoïdes est une question importante pour l'étude des défauts mitochondriaux sous différents stress. Par exemple, la perturbation des composants des nucléoïdes et les mutations de l'ADN mitochondrial ont été identifiées comme significatives dans diverses maladies, comme la carcinogenèse [170] et les maladies neurodégénératives [171]. Ces deux cas d'utilisation axés soit sur la chromatine ou soit sur les nucléoïdes des mitochondries sont illustrés dans la figure 2.2. La tâche de classification binaire correspond ici à une discrimination à partir de l'observation des marqueurs fluorescents dans des cellules individuelles. Les cas d'utilisation illustrés dans la figure 2.2-A ont été produits avec un microscope sous-résolu où les marqueurs apparaissent comme une texture et ne sont pas distinguables les uns des autres alors qu'ils ont été acquis à partir d'un microscope super-résolu dans la figure 2.2-B où les marqueurs peuvent tous être localisés individuellement. Cependant, pour obtenir la caractérisation globale d'une cellule, il n'est peut-être pas nécessaire de localiser individuellement chacun de ces marqueurs et il n'y a donc aucune garantie que la super-résolution soit obligatoire. Ces considérations sont très importantes en pratique car les microscopes super-résolus sont beaucoup plus coûteux que les microscopes

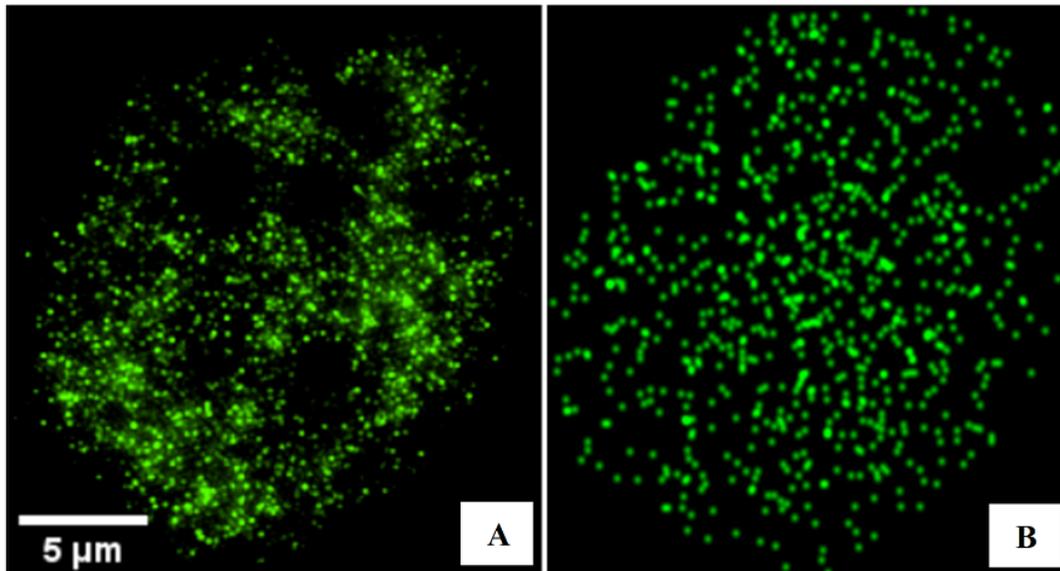


FIGURE 2.1 – Image réelle Vs image simulée. (A) Image 2D réelle d’une cellule cancéreuse C2C12 marquée à l’aide du fluophore Alexa Fluor 488 pour visualiser la protéine BMI1 et acquise avec un système de microscope à super-résolution N-SIM (Nikon Instruments) équipé d’un objectif à immersion d’huile CFI Apo TIRF 100x 1,49 NA. (B) Image synthétique générée pour imiter l’image de (A), avec une distribution de Poisson hétérogène des marqueurs et convoluée par un noyau gaussien de $\sigma_{psf} = 0.8$ simulant la PSF.

sous-résolus. Il serait donc très utile de pouvoir déterminer a priori quelle serait la meilleure résolution pour une tâche donnée afin de choisir le microscope le plus approprié ou de concevoir une fonction d’étalement du point (PSF) optimale. En pratique, pour l’acquisition optique expérimentale, plusieurs conditions d’acquisition pourraient être testées offrant différentes tailles de PSF. En simulation, un ensemble continu de PSF peut être testé librement, offrant une vue complète du comportement de la détection des cellules et permettant d’envisager quelle serait la bonne gamme de PSF avant la mise en oeuvre réelle.

Nous avons détaillé dans le cadre du premier chapitre (section 1.7.5) les approches pointillistes et texturales utilisées dans la littérature pour la caractérisation des cellules. Dans ce chapitre, nous proposons de comparer, pour la première fois à notre connaissance, les performances d’algorithmes basés sur l’identification de chaque marqueur (approche pointilliste) ou sur la caractérisation de la texture créée par ces marqueurs (approche texturale). Nous comparons les performances de ces algorithmes pour différentes tailles de fonction d’étalement du point d’un microscope et nous nous concentrons

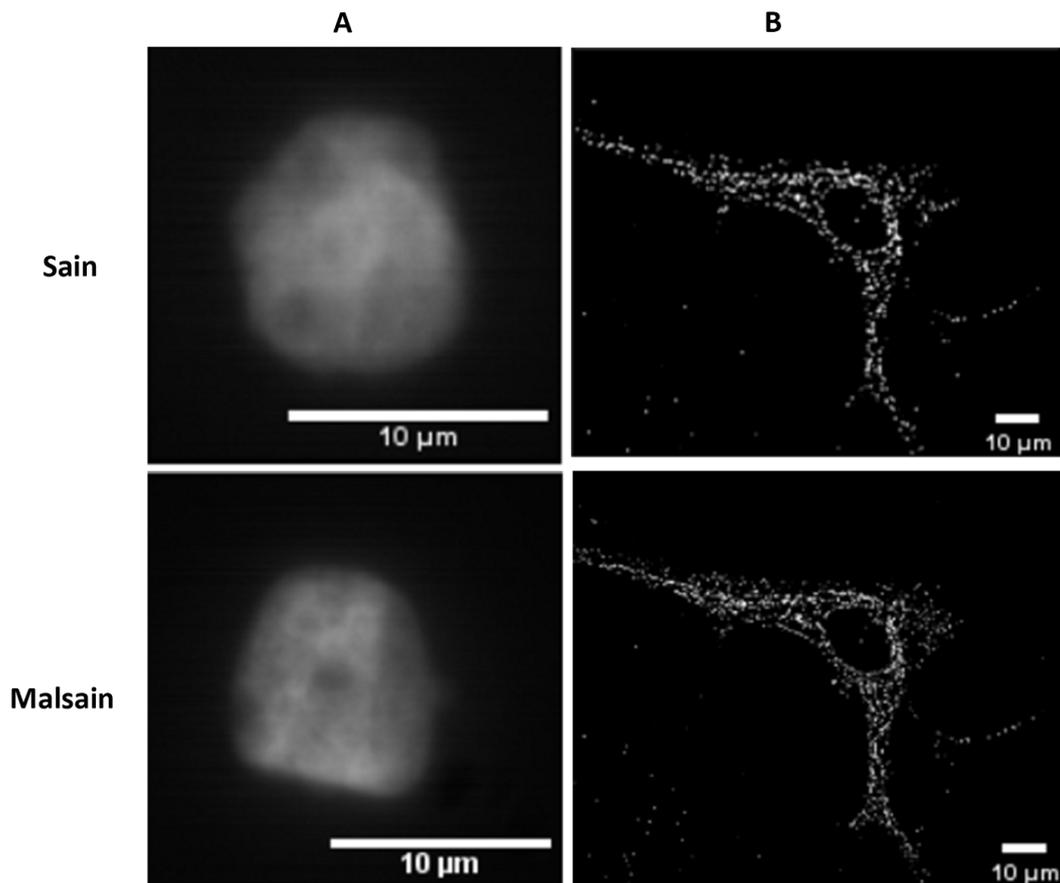


FIGURE 2.2 – Images réelles en 2D de noyaux de cellules obtenues par différentes techniques de microscopie. **(A)** Images des noyaux de cellules mammaires acquises par un système de microscopie confocale (Aurox Clarity) à éclairage structuré et à disque rotatif. L'objectif utilisé est de 63x 1.4NA à immersion d'huile, avec des longueurs d'onde d'excitation de 583 nm et d'émission de 631 nm, et regardant l'histone-H2B marquée avec mCherry. **(B)** Nucléoïdes de mitochondries de fibroblastes de la peau colorés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et acquis avec la technique de microscopie de reconstruction optique stochastique super-résolue.

spécialement sur les situations où les systèmes optiques passent de super-résolu à sous-résolu. Une telle expérience prendrait beaucoup de temps pour être réalisée avec des microscopes réels et peut bénéficier d'un schéma de simulation comme celui proposé ici et aussi comme couramment utilisé dans la littérature [145, 172, 173, 174]. Les images simulées sont produites à l'aide de PSF simulées qui imitent de manière réaliste les images fluorescentes réelles comme le montre la figure 2.1-B. Un exemple d'images réelles est également fourni dans la figure 2.1-A pour valider le résultat obtenu par simulation.

Ce chapitre est organisé de la manière suivante : le processus de simulation des

images est d'abord donné. Ensuite, les outils utilisés pour la caractérisation avec des approches texturales ou pointillistes sont décrits. La comparaison de ces espaces de caractéristiques réduits à la même dimension et appliqués au même classifieur est ensuite réalisée avant la discussion et la conclusion.

2.2 Simulation d'images de microscopie à fluorescence de cellules uniques

Deux simulations ont été réalisées pour étudier deux classifications binaires distinctes avec une différence dans la densité des marqueurs fluorescents ou une différence dans le regroupement spatial des marqueurs fluorescents, ce qui correspond à la situation pratique des cas illustrés dans la figure 2.2.

Premièrement, nous avons généré deux populations de cellules (C_1) et (C_2) avec une différence de densité de marqueurs. Les coordonnées (x, y) de chaque marqueur fluorescent ont été choisies de manière aléatoire selon des distributions gaussiennes indépendantes et identiquement distribuées sur les dimensions horizontale et verticale d'une image de $M \times N$ pixels respectivement, où $x \in \{1, 2, 3, \dots, M = 256\}$ et $y \in \{1, 2, 3, \dots, N = 256\}$. Les deux classes de cellules, imitant les cellules saines (C_1) et pathologiques (C_2), ont été générées avec une différence d'écart-type dans leurs distributions (figure 2.3-A et -B). Les paramètres ont été ajustés empiriquement pour imiter les observations sur les cellules réelles de la figure 2.1-A, avec pour les cellules saines (C_1) : $N_x(126, 100)$, $N_y(126, 100)$, un nombre total de marqueurs de 3000, la surface de la cellule est de $100 \times 100 = 10000$ pixels, et une densité résultante de marqueurs $\frac{\text{nombre de marqueurs}}{\text{surface de la cellule}} = 0.3$. Pour les cellules pathologiques (C_2), on a $N_x(126, 100)$, $N_y(126, 90)$, un nombre total de marqueurs de 3000, une surface de $100 \times 90 = 9000$ pixels, et une densité résultante de marqueurs de 0.33. La différence de densité des marqueurs entre les classes est de 0.03. Nous avons ici utilisé cette différence entre (C_1) et (C_2) pour comparer les approches pointillistes et texturales.

Deuxièmement, nous avons généré des populations de cellules avec la même densité de marqueurs mais avec une organisation spatiale différente. Nous avons considéré que la tâche consistait à détecter la différence entre les cellules avec des marqueurs de processus de Poisson hétérogènes comme (C_1) et les cellules avec des marqueurs regroupés en grappes (*clusters*) que nous avons appelé (C_3). Les marqueurs fluorescents regroupés en clusters ont été générés par un processus en deux étapes : (i) 300 points ont été générés, indépendamment les uns des autres, distribués uniformément sur l'espace

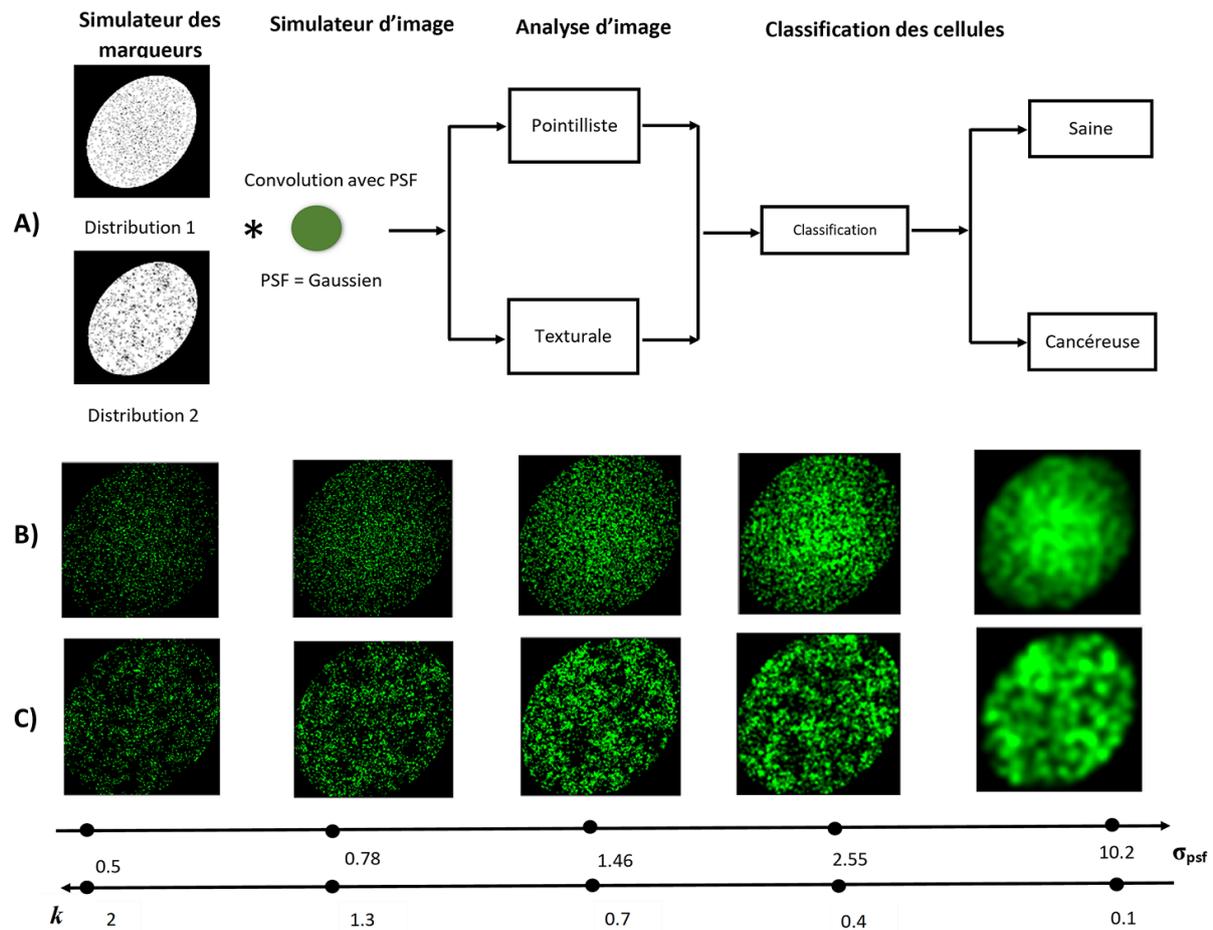


FIGURE 2.3 – Résumé visuel de l'étude. (A) Le pipeline de traitement pour simuler des cellules et les classer selon des différences en densité ou d'organisations de marqueurs fluorescents. L'image acquise par le microscope est simulée par la convolution de la distribution des marqueurs avec la PSF. Pour classifier les types de cellules, deux approches sont étudiées pour différentes valeurs de PSF : pointilliste et texturale. (B, C) Exemples d'images microscopiques synthétiques ((C_1) ou (C_2) dans le panneau (B) et (C_3) dans le panneau (C) pour différentes valeurs de σ_{psf} et le rapport k décrit dans l'équation (2.1).

horizontal et vertical de l'image puis (ii) autour de chaque points $s \in \{1, 2, 3, \dots, 300\}$, 10 marqueurs ont été générés avec une distance au point qui suit une distribution exponentielle $D_s(0, \lambda_D = \frac{1}{\mu_D})$, où λ_D est le paramètre de taux de cette distribution et μ_D est la moyenne de la distribution qui a été fixée à 35 [175]. Le nombre total de marqueurs générés dans chaque image était de 3000. Une instance de cette classe de cellules C_3 est présentée dans les figures 2.3-A et -C. L'organisation en grappes (C_3) et en processus de Poisson hétérogènes (C_1) des marqueurs a été utilisée pour comparer l'approche pointilliste et texturale. Un recadrage à l'intérieur des cellules simulées est effectué pour éviter tout problème concernant les bords des cellules simulées.

La PSF du microscope a été modélisée par un noyau de convolution, pris ici pour illustration comme un noyau gaussien de taille σ_{psf} . Les images simulées étaient alors simplement la convolution des points fluorescents positionnés de manière aléatoire ou regroupée en clusters avec la PSF (voir figure 2.3). Chaque image est de 256×256 pixels et le réalisme peut être apprécié visuellement dans la figure 2.1-A et -B. La performance de la classification entre deux types de cellules (C_1, C_2) ou (C_1, C_3) a été étudiée en fonction de la taille du PSF gouvernée par σ_{psf} . Cette situation correspond à un cas d'utilisation pratique en instrumentation où l'on cherche à concevoir la PSF d'un microscope pour une tâche informationnelle donnée. Ici, l'objectif est de trouver la condition de PSF qui permet d'obtenir la meilleure performance de classification binaire.

Le champ d'exploration de la taille de la PSF σ_{psf} a été adimensionné par la distance entre les marqueurs et présenté comme suit,

$$k = \left(\frac{d_{minC_1C_2}}{\sigma_{psf}} \right), \quad (2.1)$$

où $d_{minC_1C_2}$ est la plus petite valeur des distances minimales entre les marqueurs calculées pour C_1 et C_2 . Cette distance calculée pour l'ensemble des données simulées est $d_{minC_1C_2} = 1.02$. Nous avons exploré les valeurs de σ_{psf} autour de $k = 1$ qui intuitivement correspondent au passage entre le régime super-résolu ($k > 1$) et le régime sous-résolu ($k < 1$) comme le montre la figure 2.3-C.

2.3 Donnée réelles

En complément de la simulation, la même approche a été appliquée à un ensemble de données réelles constitué de cellules uniques mammaires saines (WT) et cancéreuses (XD) décrit dans la section 1.7.4 du chapitre 1. Ces images sont des piles d'images 3D de lignées de cellules mammaires provenant de plusieurs échantillons, acquises par un système confocal Aurox Clarity à éclairage structuré/disque rotative et en utilisant un objectif à immersion d'huile 63x 1.4NA, avec des longueurs d'onde d'excitation de 583 nm et d'émission de 631 nm, et regardant l'histone-H2B marquée avec mCherry. Les images 2D sont calculées à partir des piles d'images réelles en appliquant une transformation de projection en z. Enfin, les cellules sont segmentées en cellules uniques (taille des images de 256×256 pixels) par une segmentation via l'algorithme des forêts d'arbres décisionnels (*Random Forest*) [176] comme montré dans la figure 2.4. Ces

images réelles présentées dans la figure 2.2-A peuvent être considérées comme étant dans le régime sous-résolu en raison de la grande PSF expérimentale observée sur le microscope utilisé. La quantité totale de l'ensemble de données réelles est de 907 images de cellules cancéreuses et de 1007 images de cellules saines.

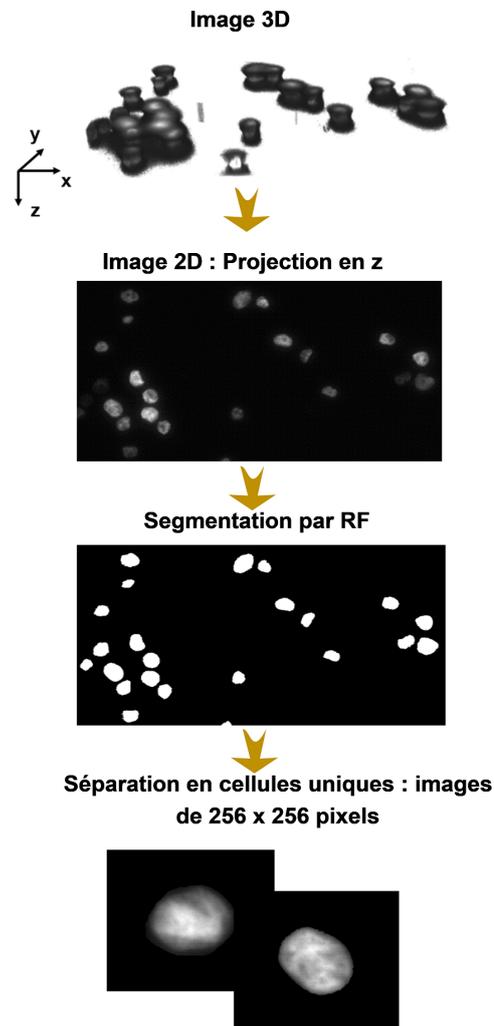


FIGURE 2.4 – Schéma descriptif du processus de génération des images de cellule uniques à partir des volumes 3D multi-cellulaires.

2.4 Localisation des marqueurs fluorescents

Une première étape avant d'étudier la distribution spatiale des marqueurs fluorescents, est de les localiser. Dans la littérature, plusieurs algorithmes de localisation de marqueurs fluorescents ont été développés, comme le ThunderSTORM [177], le DAOSTORM [178], le FALCON [179], l'algorithme de localisation des marqueurs à haute densité dans [180], etc. Une évaluation de ces outils de localisation dans [181,

182] a permis de quantifier ces performances pour la localisation de marqueurs fluorescents et le temps de calcul associé aux algorithmes. Les performances sont limitées au passage à des densités élevées de marqueurs. C'est pour cela, nous avons utilisé dans notre étude, UNLOC (*Unsupervised particle localization*), la méthode récemment introduite dans [183] et qui a montré une bonne capacité de localisation des marqueurs fluorescents à basse densité ainsi qu'à haute densité (distribution en clusters) avec un faible temps de calcul (de l'ordre de 30 minutes pour une image de 25000 tranches vs 10 heures avec ThunderSTORM).

En bref, UNLOC est un algorithme non-supervisé, rapide, flexible et efficace pour des données en super résolution (SMLM) à haute densité. Il fournit une liste de coordonnées et de paramètres associés pour les particules détectées, sans biais sur leurs localisations, pour la quantification a posteriori et la reconstruction de l'image. L'heuristique d'UNLOC garantit une précision optimale de la localisation et du comptage des particules pour n'importe quel ensemble de données SMLM avec une forte densité locale ou un fond complexe ou les deux. Il est basé sur la théorie de la décision, notamment le test du rapport de vraisemblance généralisé (GLRT, pour Generalized Likelihood Ratio Test) pour la détection des particules, sans avoir besoin d'initialiser aucun paramètre relatif aux données (SNR, densité de particules, niveau de bruit du fond, etc). Il utilise par ailleurs l'estimateur de l'erreur quadratique moyenne minimale (MMSE, pour *Minimal Mean Squared Error Estimator*) pour sa simplicité de calcul et sa robustesse dans le cas d'un scénario de haute densité pour la quantification du nombre de particules. Seuls les paramètres relatifs à la configuration optique doivent être fournis comme la taille de la PSF (σ_{psf}) du microscope pour construire un modèle gaussien qui sera ajusté pour la tâche de détection. UNLOC est un algorithme itératif qui alterne une sur-estimation du nombre de particules pour obtenir un résidu d'ajustement minimal avec un test du rapport de vraisemblance généralisé pour supprimer les particules inutiles. La procédure de comptage est effectuée en même temps que l'optimisation de la position des particules, de leur intensité et de la taille de la PSF. Il a été démontré dans [183] que UNLOC s'approche de la limite de Cramér-Rao pour la détection de particules en haute densité et sans connaissance préalable de leur intensité.

Nous avons appliqué UNLOC sur les images simulées dans les régimes sous-résolu et super-résolu. Les performances de détection des marqueurs sont présentées dans la figure 2.5. Une augmentation uniforme de la performance de détection pour les marqueurs distribués aléatoirement avec des processus de Poisson hétérogènes et l'organisation des marqueurs en grappes se produit pour une gamme de rapport $k = [0.5 \ 1.3]$ qui correspond à une taille de PSF $\sigma_{psf} < 2$. Une performance maximale d'environ

80% des marqueurs détectés se produit pour $k = 1.3$ correspondant à $\sigma_{psf} = 0.8$, la plage où UNLOC atteint une performance maximale de détection telle que trouvée dans [183] où la distance inter-marqueurs minimale est supérieure à $1.23\sigma_{psf}$ ($d_{min_{C_1C_2}} = 1.02 > 1.23\sigma_{psf}$).

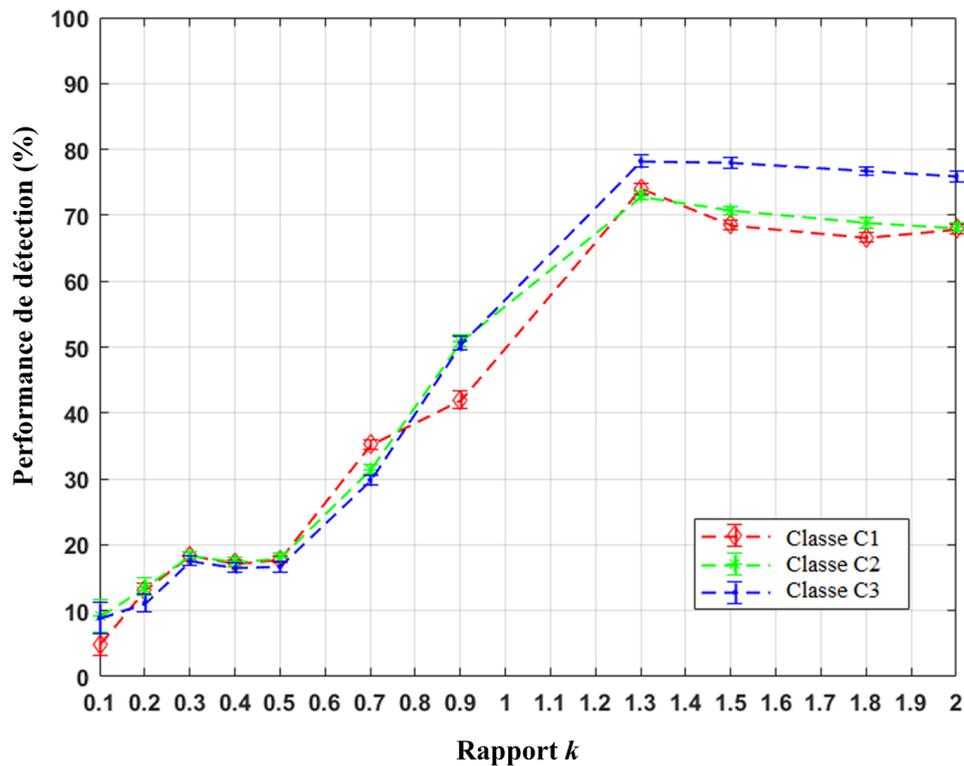


FIGURE 2.5 – Performance de la localisation des marqueurs à l'aide d'UNLOC pour les distributions aléatoires et en grappes en fonction du paramètre k de l'équation (2.1). UNLOC est plus efficace dans la gamme $k = [1.3 \ 2]$.

Après avoir extrait les marqueurs, il est possible maintenant de caractériser leur organisation à partir des descripteurs pointillistes. Dans la section suivante, nous parlons des différents espaces de caractéristiques utilisés pour le tri des cellules.

2.5 Traitement des images

2.5.1 Extraction des caractéristiques

Pour comparer la microscopie sous et super résolue pour le tri de cellules, nous avons utilisé des caractéristiques pointillistes et texturales. Ces espaces de caractéristique ont été décrits en détail dans la section 1.7.5 du chapitre 1.

2.5.1.1 Approche pointilliste

Pour l'approche pointilliste, 5 paramètres statistiques (σ_R , λ_E , ξ_G , σ_G , μ_G) sont obtenus par l'ajustement des distribution des distances avec des distributions statistiques en utilisant le critère d'inférence bayésien (BIC) défini dans l'équation (1.2). Ces distributions statistiques sont trouvées comme suit : Rayleigh $R(0, scale \sigma_R)$ pour la distance entre les marqueurs, Exponentielle $exp(0, rate \lambda_E)$ pour la distance à la moyenne et Valeur extrême généralisée $GEV(shape \xi_G, scale \sigma_G, mean \mu_G)$ pour la distance des marqueurs au plus proche voisin. De plus, nous avons utilisé la méthode d'analyse des motifs spatiaux pour les tâches de classification entre les classes de cellules avec des différences de densité de marqueurs (C_1 et C_2) et de distribution spatiale (C_1 et C_3) en exploitant les différences de courbes \hat{K} calculées selon l'équation (1.6) (voir figure 2.6).

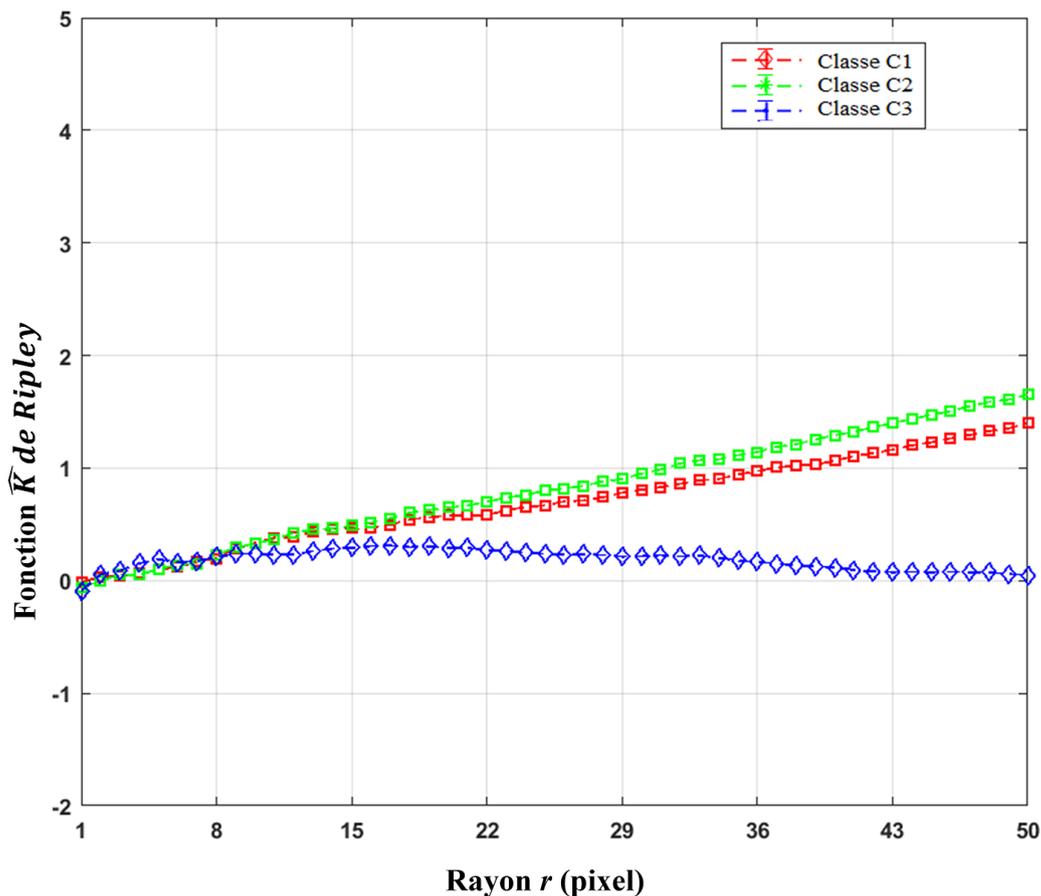


FIGURE 2.6 – Courbe $\hat{K}(r, n)$ pour la distribution des marqueurs bruts (c'est-à-dire non convolués avec une PSF) en fonction du rayon r .

2.5.1.2 Approche texturale

La fonction d'auto-corrélation, les LBP et les GLCM ont été utilisés pour l'approche texturale. La taille du voisinage d dans la méthode de GLCM a été choisie pour être un multiple de la valeur maximale de σ_{psf} , et trouvée optimale à 72 pixels (voir Annexe B) et nous avons utilisé les quatre directions θ . Le LBP a été calculé en divisant chaque image de microscopie en régions de 72×72 pixels de manière similaire à l'échelle choisie avec le GLCM. Puis un nombre de voisinages $P = 8$ et le rayon de cercle $R = 1$ ont été fixés pour le calcul des descripteurs. Finalement, pour une comparaison équitable entre les espaces de caractéristiques pointillistes et texturaux, une analyse en composantes principales a été appliquée sur les 14 coefficients d'Haralick et les descripteurs de LBP pour réduire le nombre total de descripteurs par image à 5 comme pour les descripteurs de l'approche pointilliste et de la fonction de l'auto-corrélation. Les coefficients d'Haralick les plus significatifs pour toute la gamme de tailles de PSF testées après avoir appliqué l'analyse en composantes principales se sont avérés être : le contraste, la variance, la somme des variances, la différence des variances et la somme des moyennes.

2.5.2 Classification

Les tâches de classification visaient à distinguer les populations de cellules (C_1) et (C_2) présentant une faible différence de densité des marqueurs de fluorescence et les cellules (C_1) et (C_3) présentant des organisations spatiales de marqueurs différentes. Pour une comparaison équitable, tous les espaces de caractéristiques, qu'ils soient pointillistes ou texturaux, ont été fixés à 5. Ces espaces de caractéristiques ont été appliqués au même classifieur, la machine à vecteurs de support avec un noyau linéaire. La comparaison avec d'autres classifieurs (arbre de décision, régression logistique et K-voisins les plus proches (KNN)) est également fournie dans l'annexe B. Les performances de classification (précision) ont été testées pour 11 valeurs différentes de σ_{psf} allant des régimes sous-résolus aux régimes super-résolus. Pour chaque valeur de σ_{psf} , l'ensemble des données simulées était composé de 4000 images pour l'entraînement, avec 2000 pour chaque classe, et 500 images pour le test (respectivement 250 d'images pour chaque classe). L'écart-type des performances (précision) a été calculé à l'aide de la méthode de validation croisée avec 10-folds. La précision de classification a été calculé suivant la formule,

$$Précision = \frac{VP + VN}{Total} , \quad (2.2)$$

avec, VP le nombre des vrais positifs, c.à.d, les cellules cancéreuses prédites comme cancéreuses, VN le nombre de vrais négatifs, c.à.d les cellules saines prédites comme

saines, et *Total* le nombre total des images classifiées.

La classification a également été effectuée sur l'ensemble de données réelles de la figure 2.2-A. Les résultats de la classification ont été obtenus par la méthode de validation croisée avec 10-folds.

2.6 Résultats de la classification

2.6.1 Cas de différences de densité des marqueurs

Les performances de classification entre les populations de cellules présentant de faibles différences de densité des marqueurs fluorescents (C_1, C_2) en fonction de σ_{psf} sont présentées dans la figure 2.7. Les performances de l'approche texturale dépassent toutes celles de l'approche pointilliste, que ce soit en régime sous-résolu ou en régime super-résolu. Parmi les espaces de caractéristiques texturales, l'approche texturale par auto-corrélation montre la performance de classification la plus stable pour toutes les tailles de PSF. La distribution de la distance parmi les approches pointillistes montre de bonnes performances pour la détection de la différence dans le régime super-résolu uniquement. Comme nous n'avons pas testé toutes les méthodes existantes pour les approches pointillistes et texturales, la comparaison n'est pas exhaustive. Néanmoins, il faut rappeler et souligner les choix spécifiques des méthodes testées (coefficient de Haralick, motif binaire local et auto-corrélation) qui constituent toutes des méthodes de base pour l'approche texturale. Ainsi, d'autres approches texturales pourraient sûrement fournir des résultats encore meilleurs alors que la méthode UNLOC s'avère être la référence actuelle de l'état de l'art pour les approches pointillistes [183]. Nous pouvons donc conclure que, globalement, pour la tâche de classification considérée, les espaces de caractéristiques basés sur des textures surpassent les espaces de caractéristiques basé sur des points et ce, aussi bien dans les régimes sous-résolus que super-résolus.

De plus, il faut noter qu'il n'y a pas seulement une différence de densité entre (C_1) et (C_2) mais aussi d'organisation spatiale en raison des différents écarts-types utilisés pour la simulation. C'est pourquoi une différence entre les classes de cellules (C_1) et (C_2) a été trouvée dans la fonction K de Ripley (voir figure 2.6). Si la seule différence entre les classes se situait au niveau de la densité, il n'y aurait théoriquement aucune différence dans la fonction K . C'est en effet une propriété de conception fondamentale de ce descripteur de ne capturer que les caractéristiques de second ordre d'un processus ponctuel, et d'être invariant aux changements de densité. Une variante de la simulation des classes (C_1) et (C_2) avec des différences uniquement basées sur la densité sans

l'effet de diffraction du microscope a été réalisée. Nous avons alors généré deux autres populations de cellules imitant les cellules saines (C_1) et pathologiques (C_2) avec une différence de densité de marqueurs et sans tenir compte de l'effet de diffraction du microscope. Les deux classes de cellules ont été générées avec pour les cellules saines (C_1) : $N_x(126, 100)$, $N_y(126, 100)$, un nombre total de marqueurs de 3000, et une densité résultante de marqueurs de 0.3. Pour les cellules pathologiques (C_2) on a $N_x(126, 100)$, $N_y(126, 100)$, un nombre total de marqueurs de 3100 et une densité de marqueurs résultante de 0.31. La différence de densité de marqueurs entre les classes est de 0.01. Nous avons utilisé ici cette différence entre (C_1) et (C_2) pour comparer les approches pointillistes et texturales. Les espaces de caractéristiques texturales et pointillistes sont étudiés et les performances de détection de la différence basée sur la densité sans l'effet de diffraction du microscope sont présentées dans la figure 2.9. Globalement, les performances texturales montrent le même comportement que dans le cas étudié dans la figure 2.7. Pour l'approche pointilliste, puisque la seule différence entre (C_1) et (C_2) est la densité, comme prévu aucune différence dans la fonction \hat{K} de Ripley n'est trouvée (voir figure 2.8). Cependant, lorsque la convolution et la détection avec UNLOC sont ajoutées, un effet discriminant peut se produire entre (C_1) et (C_2). De plus, les performances dans le cas de la distribution de la distance sont fortement affectées par l'efficacité de la détection UNLOC qui dépend de la taille de σ_{psf} .

2.6.2 Cas de différences d'organisation spatiale des marqueurs

Les performances de classification entre les populations de cellules présentant une différence de distribution spatiale des marqueurs fluorescents (C_1, C_3) en fonction de σ_{psf} sont présentées dans la figure 2.10. Les performances des approches de classification texturale et pointilliste sont très élevées et très proches l'une de l'autre presque partout en termes de σ_{psf} et, remarquablement dans les régimes sous-résolus. Le régime sous-résolu, sans surprise, est l'endroit où la performance de l'approche pointilliste chute. Dans ce cas de figure, certains marqueurs sont détectés comme des artefacts et l'organisation spatiale des deux populations de cellules devient très proche, de sorte que la discrimination entre elles diminue. Ceci est illustré dans la figure 2.11 avec l'évolution globale des fonctions \hat{K} de Ripley lorsqu'elles sont tracées pour différents σ_{psf} .

2.6.3 Test sur données réelles

Les performances de classification entre les populations de cellules mammaires saines et cancéreuses de l'ensemble de données réelles issues de la technique de microscopie sous-résolue de la figure 2.2-A sont présentées dans le Tableau 2.1. Pour une

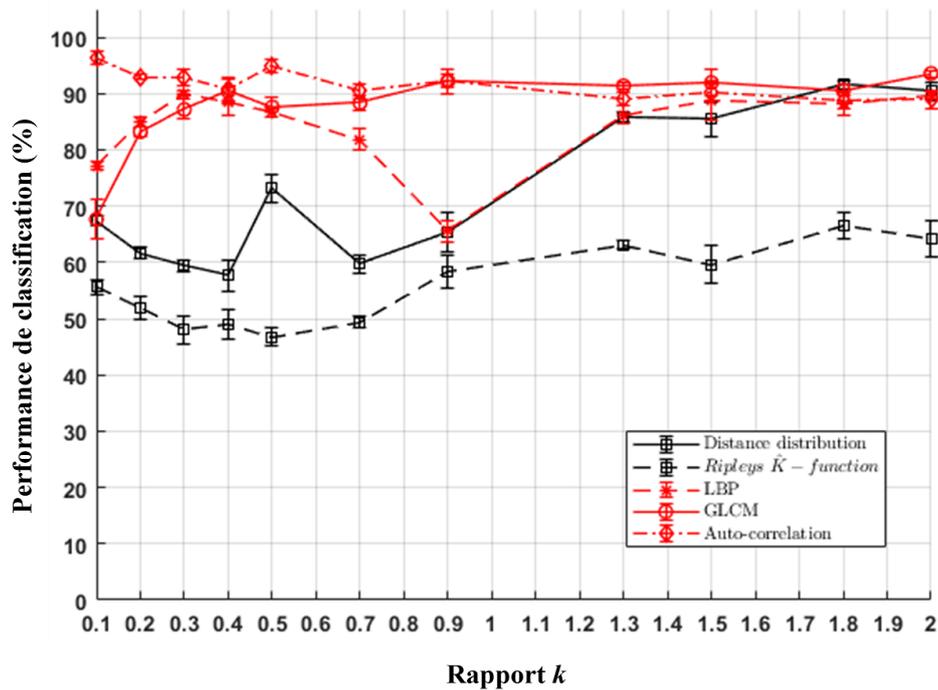


FIGURE 2.7 – Performance de la classification binaire pour la différence de densité de marqueurs entre les classes de cellules C_1 et C_2 en fonction du paramètre k de l'équation (2.1) pour les approches texturales et pointillistes. Plus k est élevé, plus la taille de la PSF est petite. L'écart-type des performances est calculé en utilisant la méthode de validation croisée à 10-folds. En rouge, les méthodes suivant l'approche texturale, et, en noir, les méthodes suivant l'approche pointilliste.

comparaison globale avec les résultats des données synthétiques, les comportements des performances sont globalement similaires. L'approche d'auto-corrélation de l'espace de caractéristiques texturales montre la meilleure performance de classification avec un écart important par rapport aux autres espaces de caractéristiques texturales et pointillistes proposés. Contrairement à ce qui a été trouvé dans la simulation, la performance du LBP est inférieure à celle du GLCM. Cela peut provenir du fait que le LBP est sensible au bruit tel que le bruit thermique de la caméra. Ce bruit n'a pas été pris en compte dans la simulation. D'autres variantes du LBP ont été proposées dans la littérature comme le modèle binaire médian (MBP, pour *median binary pattern*) [184], les modèles ternaires locaux (LTP, pour *local ternary patterns*) [185]. Ceux-ci pourraient être testés pour contourner ce problème de sensibilité au bruit. Un autre point important pour évaluer la valeur d'un espace de caractéristiques réside dans son temps de calcul. Ils sont présentés dans le tableau 2.2. Un compromis entre les performances et le temps de calcul est trouvé avec l'espace de caractéristiques texturales basé sur la fonction d'auto-corrélation.

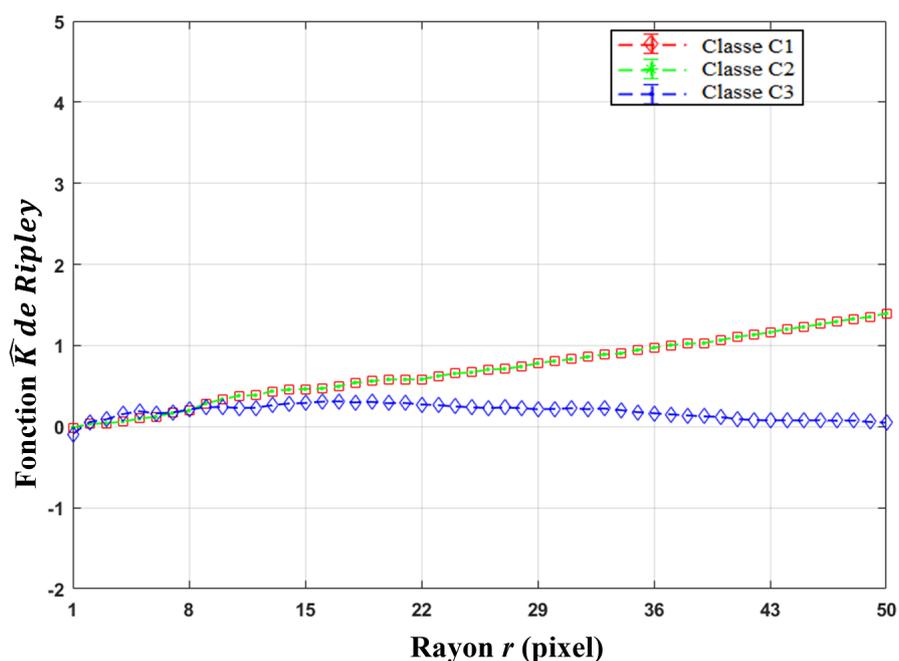


FIGURE 2.8 – Courbe $\hat{K}(r, n)$ pour la distribution des marqueurs bruts (c'est-à-dire non convolués avec une PSF) en fonction du rayon r sans l'effet de diffraction de microscope.

TABLEAU 2.1 – Résultats de la classification des méthodes étudiées appliquées à l'ensemble des données réelles de la figure 2.2.A

Espaces de caractéristiques	Donnée réelle
<i>Auto-correlation</i>	$94.5 \pm 0.18 \%$
<i>GLCM</i>	$70 \pm 1.4 \%$
<i>LBP</i>	$64 \pm 1.4 \%$
<i>Distribution des distances</i>	$78.8 \pm 0.7 \%$
<i>Fonction \hat{K} de Ripley</i>	$69 \pm 1.7 \%$

TABLEAU 2.2 – Temps de calcul des caractéristiques moyenné sur 100 images réelles

Espaces de caractéristiques	Temps de calcul (en ms)
<i>Auto-correlation</i>	0.66
<i>GLCM</i>	0.12
<i>LBP</i>	6.3
<i>Distribution des distances</i>	340
<i>Fonction \hat{K} de Ripley</i>	68790

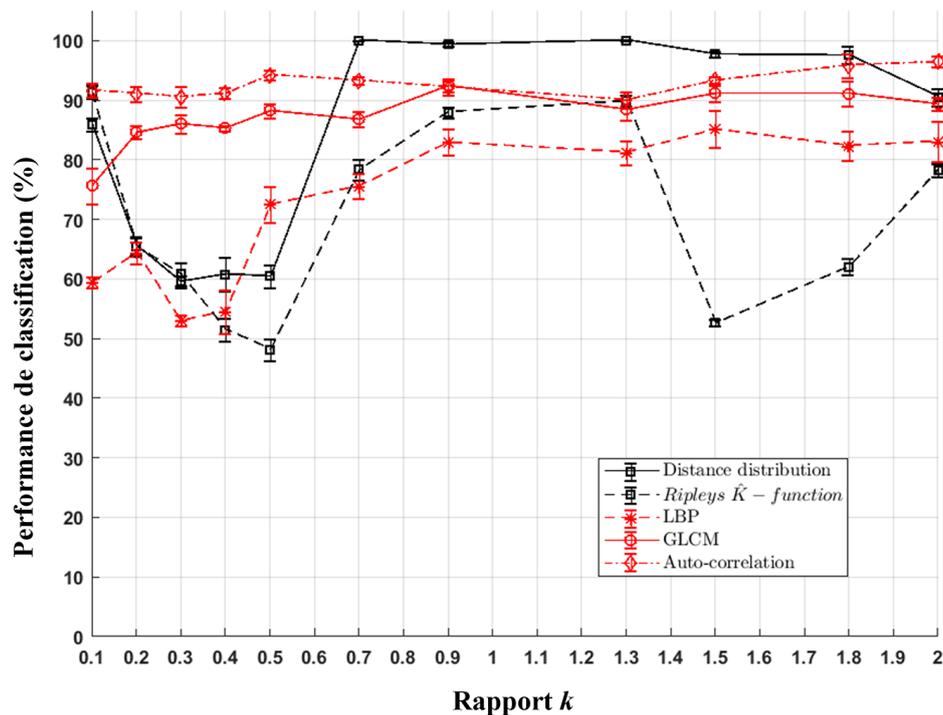


FIGURE 2.9 – Performance de la classification binaire pour la différence de densité de marqueurs entre les classes de cellules C_1 et C_2 sans l'effet de diffraction de microscope en fonction du paramètre k de l'équation (2.1) pour les approches texturales et pointillistes. Plus k est élevé, plus la taille de la PSF est petite. L'écart-type des performances est calculé en utilisant la méthode de validation croisée à 10-folds. En rouge, les méthodes suivant l'approche texturale, et, en noir, les méthodes suivant une approche pointilliste.

2.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié, à la fois sur des cellules uniques simulées et sur des cellules mammaires uniques réelles, différents espaces de caractéristiques pour une classification binaire fiable liée à des différences d'organisation spatiale des marqueurs fluorescents. A cet effet, nous avons simulé deux classes d'images de cellules (saines et pathologiques) avec des marqueurs fluorescents présentant soit une faible différence de densité, soit une différence d'organisation spatiale. Nous avons ensuite simulé différentes tailles de PSF de microscope autour du changement de régime entre super-résolution et sous-résolution des marqueurs. Ces ensembles de données synthétiques ont servi à comparer les performances de détection à la fois avec une approche texturale et une approche pointilliste. Nous avons constaté que l'approche texturale atteint de meilleures performances dans tous les régimes, qu'ils soient sous-résolus ou super-résolus. Nous avons également testé un ensemble de données réelles acquises par microscopie sous-résolue. Conformément aux résultats obtenus sur les données

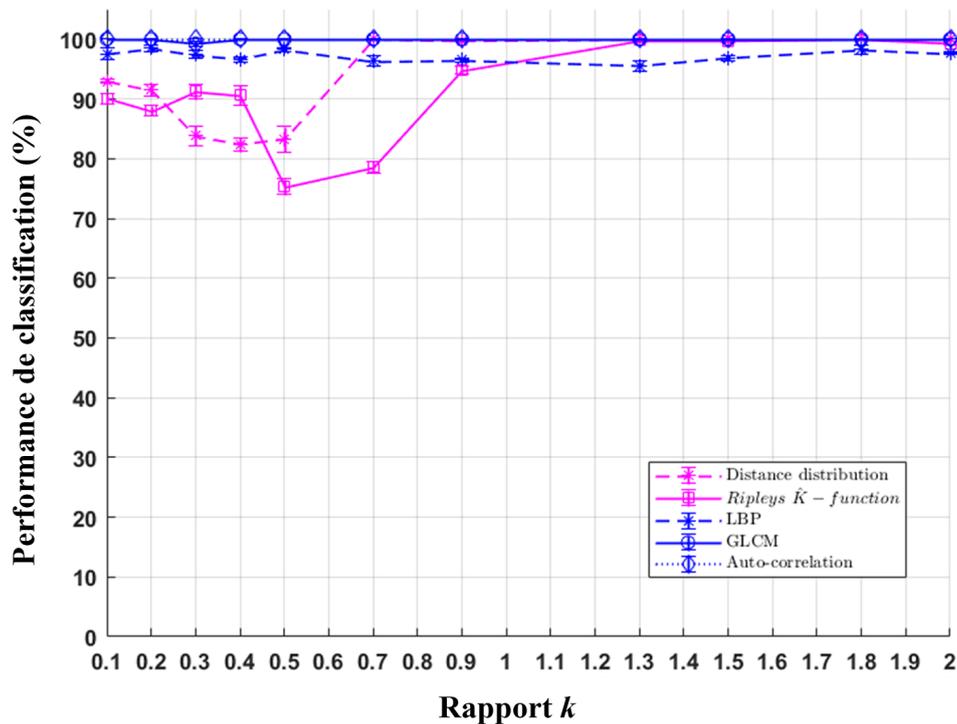


FIGURE 2.10 – Performance de la classification binaire pour les différences d'organisation spatiale des marqueurs pour les classes de cellules C_1 et C_3 en fonction du paramètre k de l'équation (2.1) pour les approches texturales et pointillistes. Plus k est élevé, plus la taille du PSF est petite. L'écart-type des performances est calculé en utilisant la méthode de validation croisée à 10-folds. En bleu, les méthodes suivant l'approche texturale, et, en rose, les méthodes suivant une approche pointilliste.

synthétiques, les résultats de cet ensemble de données réelles ont montré que les performances de classification obtenues en utilisant l'approche texturale d'auto-corrélation surpassent les méthodes texturales de GLCM et LBP ainsi que les approches pointillistes.

Quelque peu contre-intuitif si l'on considère la quête actuelle de la super-résolution, ce résultat, fort et important sur le plan pratique, démontre qu'il n'est peut-être pas toujours nécessaire de rechercher systématiquement des techniques de super-résolution ou d'effectuer une déconvolution fastidieuse lorsqu'on observe l'organisation spatiale collective de marqueurs fluorescents en microscopie cellulaire unique. Ce résultat est plus courant en traitement du signal. En effet, une analogie est trouvée dans les méthodes d'estimation de densité basées sur le noyau (la PSF dans le cas étudié ici) où il étend l'information contenue dans les points discrets à une zone plus large et contribue ainsi à créer sa représentation continue. Cette représentation est plus facile à manipuler que la représentation discrète. De retour en microscopie, lorsque la détection ou la classification est visée, les images sous-résolues peuvent transporter suffisamment

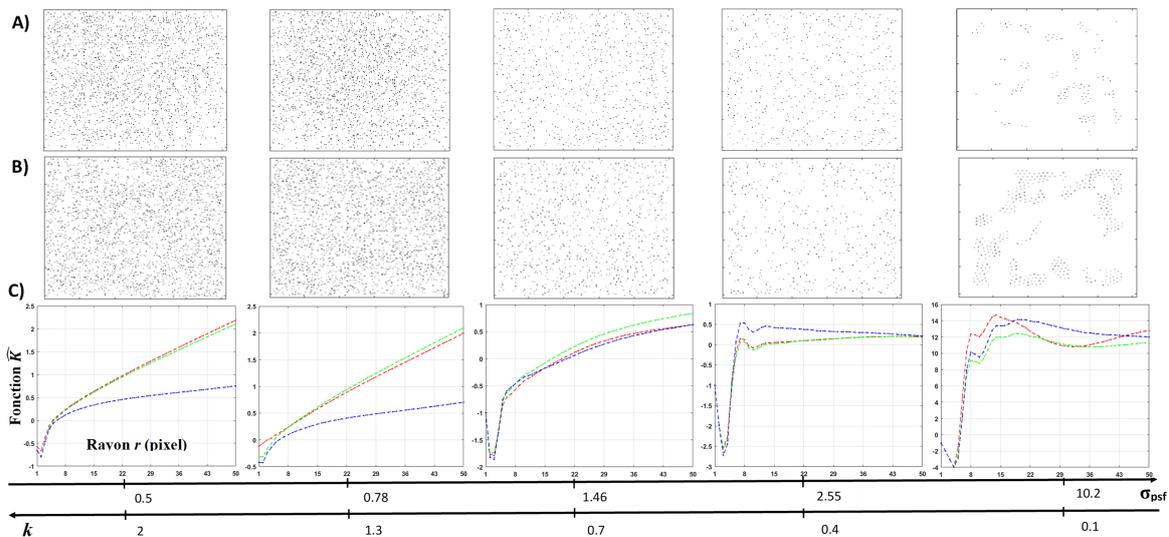


FIGURE 2.11 – Influence de la taille du PSF (rapport k) sur les fonctions de Ripley $\hat{K}(r, n)$ des marqueurs localisés en utilisant UNLOC. **(A)** Visualisation des marqueurs localisés dans le cas d’une distribution aléatoire. **(B)** Visualisation des marqueurs localisés dans le cas d’une distribution en grappes. **(C)** Courbes $\hat{K}(r, n)$. L’organisation spatiale des marqueurs fluorescents change en fonction de la taille du PSF. Globalement, pour les petites tailles de PSF (images de super-résolution), l’organisation des marqueurs montre une organisation similaire à celle des données brutes. En passant à des images de sous-résolution (grande taille de PSF), l’organisation spatiale des marqueurs détectés change en raison de la détection manquée causée par la baisse de sensibilité de UNLOC.

d’information pour permettre des performances élevées. Ceci a été obtenu ici avec des images simulées où la vérité terrain a été établie automatiquement et avec un ensemble de données réelles. Cela correspond exactement à la situation où les cellules peuvent être triées automatiquement sur la base d’un plan d’expérience biologique ou en utilisant la cytométrie de flux standard. Si une telle vérité terrain ne peut être établie, il se peut que, de manière similaire à ce qui se passe en histologie, seule une inspection humaine visuelle de la cellule puisse permettre de constituer une référence sur laquelle l’apprentissage supervisé peut être entraîné. Dans ce cas, même pour des tâches de classification, une super-résolution couplée à une sous-résolution peut être nécessaire. Cependant, si des tels couples sont constitués pendant l’apprentissage, alors seules les images de sous-résolution peuvent être utilisées pour la classification pendant le test, comme le montre ce chapitre.

Des investigations supplémentaires pourraient être menées dans au moins deux directions. Premièrement, seules les tâches de classification binaire ont été considérées dans ce chapitre et il pourrait être intéressant de considérer si d’autres tâches informationnelles, comme la régression, pourraient bénéficier de l’approche proposée. La

méthodologie globale pourrait ainsi être utilisée en instrumentation pour valider la qualité d'une PSF pour une tâche informative donnée. Deuxièmement, dans ce chapitre, la PSF du microscope était volontairement naïve sous la forme d'un simple noyau gaussien 2D. La méthodologie proposée pourrait être transposée sans aucune difficulté à tout type de PSF plus réaliste et peut même être étendue en 3D. De plus, la simulation des marqueurs fluorescents était simplement une génération aléatoire de points dans l'espace 2D de l'image, cette simulation pourrait être remplacée par une simulation plus réaliste de particules en modélisant les chaînes de chromatine 3D à l'intérieur du noyau d'une cellule comme montré dans le chapitre suivant (chapitre 3).

Optimisation des coûts microscopique pour le tri de cellules uniques

Sommaire du présent chapitre

3.1 Introduction	60
3.2 Simulation d'images de cellules uniques en microscopie confocale	61
3.2.1 Simulation de chaînes 3D de chromatine et de marqueurs fluorescents	61
3.2.2 Modélisation de la fonction d'étalement du point	62
3.2.3 Simulation des images microscopiques	64
3.3 Traitement des images	66
3.3.1 Extraction des caractéristiques texturales	66
3.3.2 Classification	67
3.4 Résultats et discussion	68
3.4.1 Images simulées	68
3.4.2 Images réelles	69
3.5 Conclusion	72

3.1 Introduction

Ce chapitre étend le travail du chapitre 2 dans plusieurs directions. D'un côté, nous proposons de discuter l'intérêt d'une image 2D sous-résolue couplée à un espace de caractéristiques texturales pour trier les cellules cancéreuses et saines par comparaison avec des images 3D. Il s'agit d'une question importante en microscopie computationnelle, car l'imagerie 3D est beaucoup plus lente à acquérir que l'imagerie 2D. Et d'un autre côté, nous étudions l'intérêt de l'approche d'imagerie sans lentille pour le tri de cellules par comparaison avec une approche d'imagerie conventionnelle. L'imagerie sans lentille consiste en une imagerie diffractive où le module de la transformée de Fourier est directement capturé via l'acquisition de la figure de diffraction de Fraunhofer [54]. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour une cytométrie rapide et peu coûteuse, permettant de trier les cellules sur la base des figures de diffraction de Fraunhofer sans avoir besoin d'un l'objectif pour le microscope.

Par rapport à l'étude présentée dans le chapitre 2, premièrement nous avons augmenté le réalisme de la simulation des marqueurs fluorescents en remplaçant la simulation aléatoire dans l'espace 2D par une simulation plus réaliste en modélisant les chaînes 3D de chromatines. Deuxièmement, nous avons remplacé la fonction d'étalement du point (PSF) par un modèle de PSF plus réaliste d'un microscope confocal. Ainsi, nous considérons des tâches qui consistent à classifier les différences dans l'organisation spatiale de ces marqueurs fluorescents soit en termes de densité, soit en termes de distribution. Les différentes tâches de classification binaires correspondent ici à une détection entre sain et pathologique (cellule cancéreuse) à partir de l'observation des marqueurs fluorescents à l'intérieur des cellules individuelles soit en 2D ou en 3D [186], soit dans le domaine spatial ou spectral (module de Fourier) [187] comme illustré dans la figure 3.1. Dans cette étude, nous basons la classification sur des caractéristiques texturales comme nous avons montré dans le chapitre précédent (chapitre 2) que nous étions capables de trier les cellules cancéreuses des cellules saines en se basant sur les espaces de caractéristiques texturales aussi efficacement que les caractéristiques pointillistes. Ces tâches de classification binaires sont effectuées à la fois avec des images de cellules simulées et réelles.

Ce chapitre est organisé de la manière suivante. Le processus de simulation des images 3D et 2D dans l'espace spatial et dans l'espace spectral de Fraunhofer est d'abord donné. Ensuite, les outils utilisés pour la caractérisation des cellules vues comme des textures sont détaillés. Enfin, la comparaison entre les différents modes (2D vs 3D, spatial vs spectral) est fournie pour différentes résolutions allant de la sous-résolution à

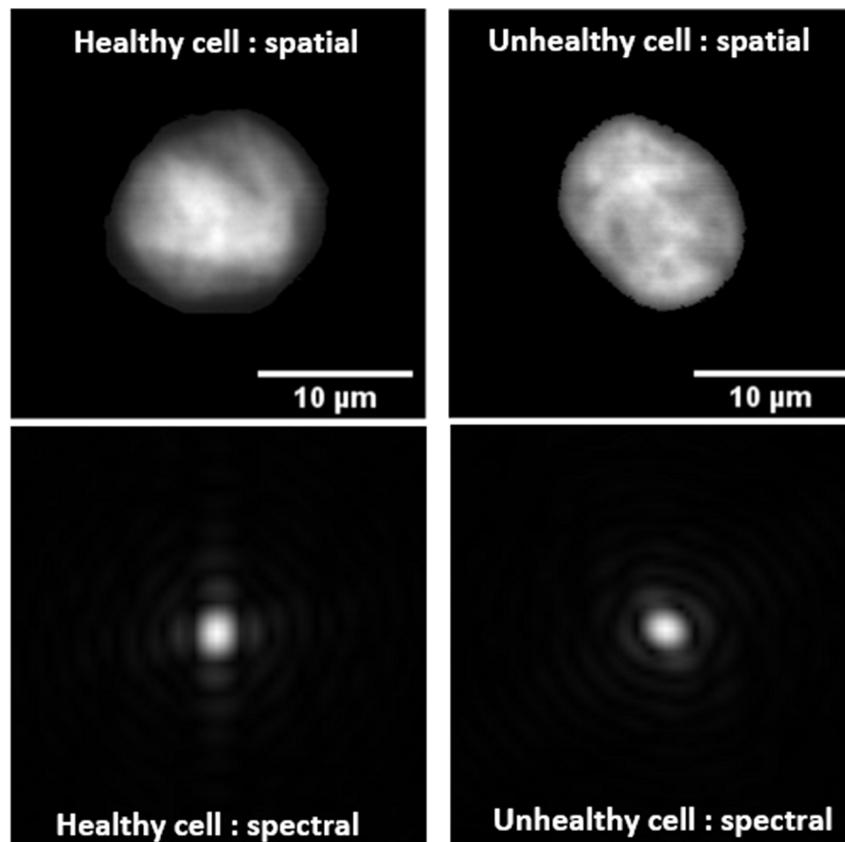


FIGURE 3.1 – Images 2D de noyaux sains et cancéreux de cellules mammaires à trier. Ligne supérieure dans l'espace spatial ; ligne inférieure dans l'espace de Fraunhofer diffractif correspondant au module de la transformée de Fourier de la ligne supérieure. Les images sont acquises par un système de microscopie confocale (Aurox Clarity) à éclairage structuré et à disque rotatif. L'objectif utilisé est de 63x 1.4NA à immersion d'huile, avec des longueurs d'onde d'excitation de 583 nm et d'émission de 631 nm, et regardant l'histone-H2B marquée avec mCherry.

la super-résolution.

3.2 Simulation d'images de cellules uniques en microscopie confocale

3.2.1 Simulation de chaînes 3D de chromatine et de marqueurs fluorescents

Plusieurs types de simulateurs de chromatine ont été développés dans la littérature, allant de la simulation globale de la fluorescence en 2D [188], à la simulation des chaîne 3D de chromatine et d'ADN comme dans [189, 190, 191, 192] ou encore la simulation de séries dynamiques d'images 3D de la microscopie à fluorescence [193]. Dans ce

travail, les images 3D et 2D de cellules uniques sont générées à l'aide d'un simulateur basé sur la modélisation de chaînes 3D de chromatine [192]. Nous avons utilisé cette méthode en raison de sa simplicité par rapport aux autres simulateurs de chromatine de la littérature et sa capacité à générer 16 chaînes de chromatines avec 100 configurations différentes pour chacune. Cette simulation est inspirée de la technique de capture de la conformation des chromosomes (3C) qui mesure les fréquences d'interaction entre les loci du génome à longue distance. Cette étape de simulation utilise une approche bayésienne pour dériver l'architecture 3D de la chromatine. Chaque brin de chromatine est considéré comme un polymère linéaire composé d'un certain nombre de segments. Le but de la modélisation est alors de dériver les coordonnées 3D des points d'extrémité de ces segments. Cela peut être fait en utilisant l'inférence bayésienne pour intégrer systématiquement les fréquences d'interaction d'entrée avec l'énergie de conformation d'une structure de chromatine qui décrit le potentiel physique ou statistique d'une conformation de chromatine [194]. Nous avons utilisé les chaînes 3D de chromatine comme des supports pour les marqueurs fluorescents qui sont distribués le long des chaînes générées de telle manière à ce que la distance entre deux marqueurs fluorescents successifs suive une distribution uniforme (U) ou gaussienne (G). La combinaison de ces deux étapes génère un nuage de points 3D de marqueurs fluorescents simulant l'ADN dans le volume cellulaire, qui est ensuite convolué avec une PSF 3D, comme le montre la figure 3.2.A.

3.2.2 Modélisation de la fonction d'étalement du point

Pour une technique de microscopie de fluorescence, l'ouverture numérique de l'objectif utilisé est l'élément clé qui permet d'améliorer la résolution et les capacités de sectionnement de l'instrument. La résolution d'un système est définie comme la distance minimale à laquelle deux objets ponctuels peuvent encore être résolus. En utilisant le critère de Rayleigh, la résolution latérale minimale $r_{laterale}$ définie comme la distance du maximum de la tâche d'Airy au premier zéro pouvant être obtenu selon l'approximation paraxiale (c'est-à-dire que les parties du champ électromagnétique se propageant dans le plan $x - y$ sont supposées petites par rapport à celles qui se propagent dans la direction z) s'écrit selon l'équation suivante [35],

$$r_{laterale} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}, \quad (3.1)$$

où NA est l'ouverture numérique de l'objectif et λ est la longueur d'onde de la lumière. Le rayon de la tâche d'Airy peut être approximé par une gaussienne dont la largeur est

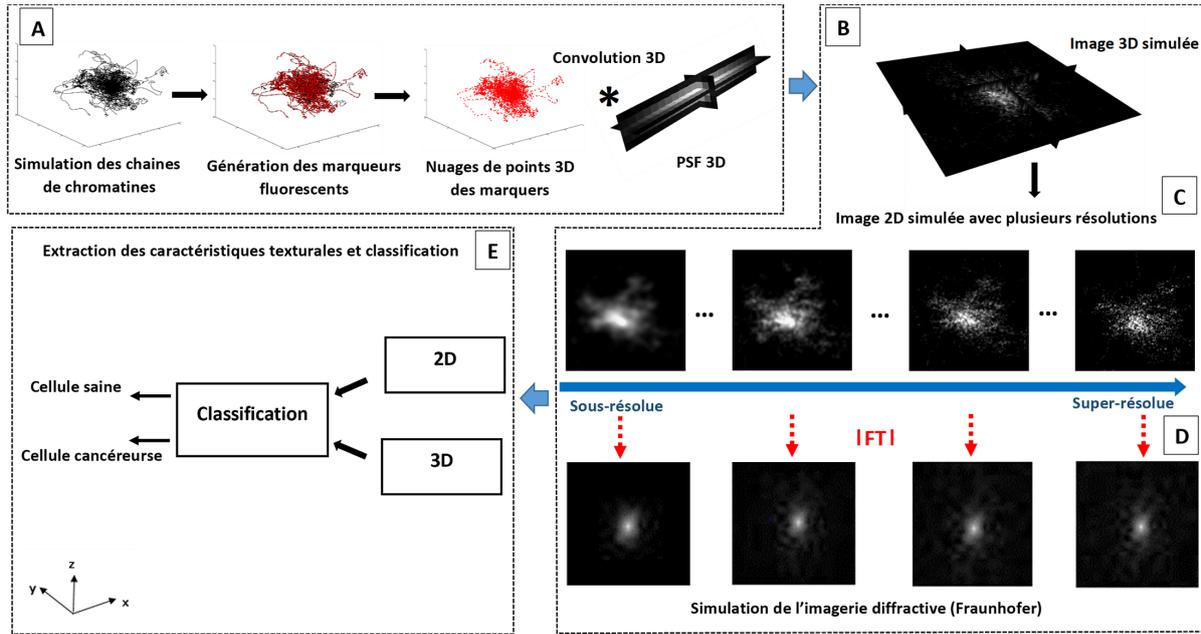


FIGURE 3.2 – Pipeline général de l'étude. (A) Simulation de chaînes de chromatine 3D avec différentes configurations spatiales. Les marqueurs fluorescents sont générés aléatoirement (distribution uniforme ou gaussienne) sur les chaînes formant un nuage de points 3D. Ensuite, une étape de convolution est appliquée avec une PSF 3D de différentes tailles. (B) Image 3D générée. (C) Les images 2D correspondantes avec différentes résolutions dans le domaine spatial. Ces images sont calculées comme les images 2D situées dans le plan focal de l'objectif pour le cas d'un microscope confocal. (D) Le module de la transformée de Fourier est appliqué pour toutes les images générées en 2D afin de générer des images de diffraction de Fraunhofer. (E) Les caractéristiques texturales sont extraites des images 3D et 2D (spatial et spectral) et sont ensuite utilisées pour classer les cellules saines/cancéreuses après réduction de dimensions avec le même classificateur.

égale à,

$$\sigma_r = 0.21 \frac{\lambda}{NA}. \quad (3.2)$$

La résolution axiale minimum de la tache d'Airy dans la direction z peut être décrite selon l'équation suivante,

$$r_{axiale} = 2 \frac{n\lambda}{NA^2}. \quad (3.3)$$

De même, cette résolution pourra être approximée avec une gaussienne dont la largeur en z est donnée comme suit [120, 195],

$$\sigma_z = 0.75 \frac{n\lambda}{NA^2}, \quad (3.4)$$

avec n est l'indice de réfraction du milieu de l'immersion de la lentille de l'objectif. Les équations (3.2) et (3.4) peuvent être utilisées pour modéliser la PSF 3D d'une technique

de microscopie à champ large. Finalement, pour un microscope confocal, et pour une performance de sectionnement idéale, l'écart-type gaussien (σ) doit être réduit d'un facteur de $\sqrt{2}$, et la taille finale de la PSF d'un microscope confocal 3D peut donc être modélisée comme suit,

$$\sigma_{r,c} = 0.15 \frac{\lambda}{NA}, \quad (3.5)$$

$$\sigma_{z,c} = 0.53 \frac{n\lambda}{NA^2}. \quad (3.6)$$

Dans notre étude, nous simulons la fonction PSF comme un noyau gaussien avec des tailles latérales et axiales selon les équations (3.5) et (3.6) respectivement. Différentes tailles de la PSF peuvent être générées pour une longueur d'onde λ et un indice de réfraction du milieu d'immersion n donnés, en changeant l'ouverture numérique NA . Pour notre étude, nous supposons que l'objectif utilisé est immergé dans de l'huile d'indice de réfraction $n = 1.51$ et que les images sont acquises dans le canal rouge avec une longueur d'onde de laser $\lambda = 610 \text{ nm}$. Nous avons simulé sept PSF 3D différentes avec diverses résolutions latérales ($\sigma_{r,c}$) et axiales ($\sigma_{z,c}$) en changeant la valeur de NA comme illustré dans le tableau 3.1. Un exemple des plans médians XY, XZ et YZ pour une PSF 3D générée pour $NA = 1$ est présenté dans la figure 3.3. À noter que la résolution latérale et axiale augmente si un objectif avec NA élevé est utilisé et que la résolution latérale est toujours plus grande que la résolution axiale (PSF allongée en z).

TABLEAU 3.1 – Exemples de résolutions latérales ($\sigma_{r,c}$) et axiales ($\sigma_{z,c}$) des PSFs 3D simulées en fonction des valeurs de l'ouverture numérique NA . Lorsque la valeur de NA diminue, la résolution diminue.

Résolution	NA				
	basse rés. ←		→ haute rés.		
	0.2	0.4	0.8	1	1.4
$\sigma_{r,c}$ en nm	457	229	114	92	65
$\sigma_{z,c}$ en nm	12 205	3051	769	488	245

3.2.3 Simulation des images microscopiques

Les images simulées résultent de la convolution des points fluorescents positionnés avec les PSFs générées. Pour réduire le temps de calcul, les chaînes de chromatine 3D sont interpolées pour s'adapter à l'espace de $256 \times 256 \times 30$ pixels afin que les images finales simulées par microscopie fluorescente 3D soient générées avec la même taille. Chaque pixel dans le plan d'image latéral est équivalent à $0.1031 \mu\text{m}$. Enfin, les images 2D sont extraites de chaque image de microscopie confocale 3D comme le plan situé

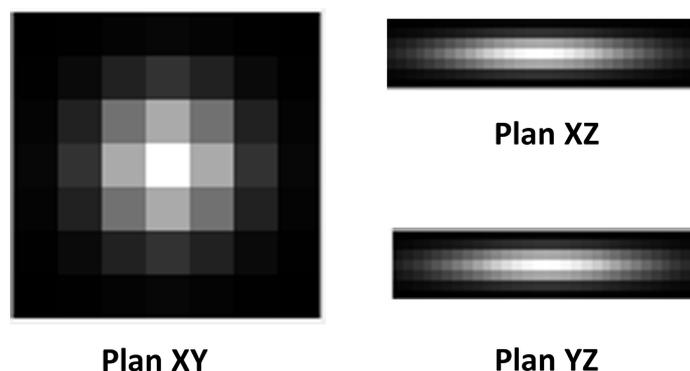


FIGURE 3.3 – Illustration des plans médians XY, XZ et YZ pour une PSF confocale 3D générée pour une ouverture numérique $NA = 1$.

dans le plan focal de l'objectif (plan XY au milieu du volume 3D)(voir figure 3.2-B,C). Ensuite, la figure de diffraction de Fraunhofer est simulée en calculant le module de la transformée de Fourier des images 2D conventionnelles (voir figure 3.2-D). Grâce à ce schéma, nous produisons des images 3D et 2D des mêmes cellules dans des espaces spatiaux et fréquentiels avec une résolution variable.

Pour étudier les limites de la classification des cellules saines et cancéreuses en utilisant la microscopie confocale 3D ou 2D, et les domaines spatiaux ou spectraux, nous proposons une approche de simulation basée sur la génération de deux classes de cellules (saines et pathologiques) selon deux expériences numériques :

- Première expérience : nous avons fixé la configuration des chaînes de chromatines et introduit une différence de densité de fluorescence définie par un faible changement de la distance uniforme d entre deux marqueurs successifs, de telle sorte que $d \sim U_{sain}(0, 100)$ pour les cellules saines et $d \sim U_{malsain}(0, 110)$ pour les cellules pathologiques (voir figure 3.4, cas I et II).
- Deuxième expérience : nous avons fixé la configuration des chaînes de chromatines et ajouté une petite différence dans la distribution des marqueurs fluorescents de telle sorte que $d \sim U_{sain}(0, 100)$ et $d \sim G_{malsain}(\mu = 50, \sigma = 50)$ (voir figure 3.4, cas I et III).

La quantité finale de données synthétiques 3D et 2D (spatial et spectral) générées pour chaque valeur de NA est d'environ 2000 images, correspondant à 1000 images pour chaque classe de cellules.

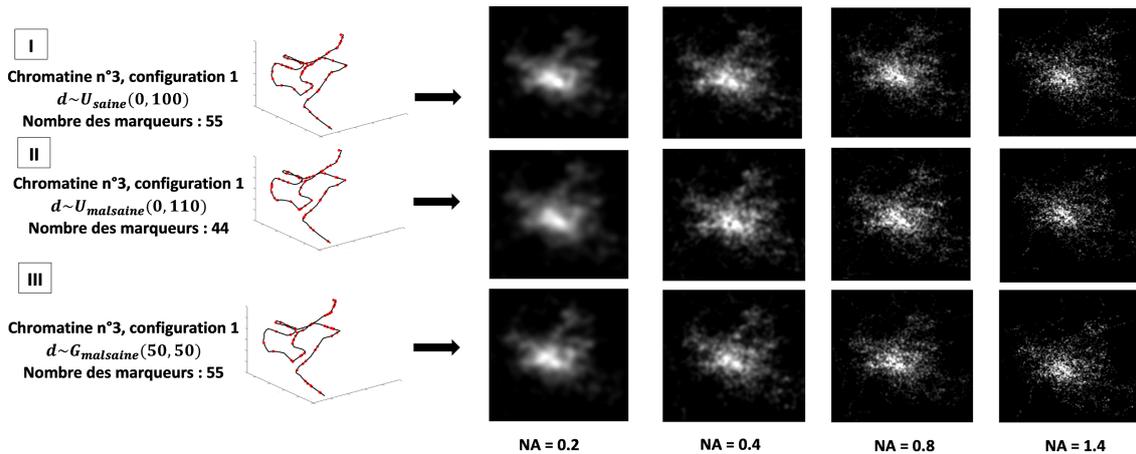


FIGURE 3.4 – Vue d’ensemble des cas étudiés. À gauche : illustration de la simulation de deux classes de cellules avec (I,II) des différences de densité de marqueurs fluorescents en changeant le paramètre de distribution uniforme et (I,III) des différences de distribution de marqueurs fluorescents en changeant la distribution de probabilité des marqueurs générés d’uniforme (U) à gaussienne (G). À droite : exemples d’images simulées pour chaque configuration de marqueurs fluorescents et pour différentes valeurs d’ouverture numérique (NA).

3.3 Traitement des images

3.3.1 Extraction des caractéristiques texturales

Dans le chapitre précédent, nous avons montré l’efficacité des espaces de caractéristiques texturales pour trier les cellules en utilisant des images sous-résolues. Nous proposons dans la présente étude, et pour une comparaison équitable de la valeur de l’image 3D volumique et de l’image 2D située au plan focal du microscope confocal en charge de la classification binaire des cellules, de baser la classification sur le même type d’espace de caractéristiques texturales, sur le même classifieur et sur la même dimensionnalité après réduction de dimension.

Une variété d’approches texturales planaires et volumétriques ont été proposées dans la littérature et ont été comparées pour des cas 2D et 3D d’images microscopiques [196, 197]. À titre d’illustration dans cette étude, et sans aucune prétention d’optimalité puisque le but est la comparaison entre les images 3D et 2D, nous considérons le motif binaire local de trois plans orthogonaux (LBP-TOP, pour *Local Binary Pattern from Three Orthogonal Planes*) pour les images 3D [156] et le motif binaire local classique (LBP) pour les images 2D. Nous considérons également la méthode classique de la matrice de co-occurrence des niveaux de gris (GLCM) pour les images 3D [198,

199, 200] et 2D. Enfin, nous incluons un espace de caractéristiques profondes basée sur des réseaux de convolution de transformée en scattering (*scattering transform*) [158] appliquée aux images 2D et aux trois plans orthogonaux XY, XZ and YZ des images 3D calculés comme la somme de projection en z, y et x respectivement.

Les méthodes d'extraction des caractéristiques 2D et 3D utilisées dans cette étude ont été décrites dans la section 1.7.5.2 du chapitre 1. Pour la présente étude, les hyperparamètres de chaque méthode ont été choisis comme suit :

- La taille du voisinage P , pour le LBP et le LBP-TOP a été choisie pour être supérieure à la valeur maximale de la résolution latérale σ_r , et s'est avérée optimale à $P = 8$ pixels, tandis que les rayons ont été optimisés empiriquement et fixés à $RX = RY = 1$ et $RZ = 4$.
- Pour les méthodes de GLCM 2D et 3D, nous avons utilisé respectivement 4 et 13 directions et fixé la valeur de voisinage $d = d_x = d_y = d_z = 8$ pixels, d'une manière similaire à l'échelle utilisée pour le LBP.
- Les caractéristiques texturales de la transformée en scattering ont été calculées avec le filtre de Gabor comme l'ondelette mère avec les paramètres de la transformée en scattering qui ont été optimisés d'une manière empirique avec $m = 3$ couches pour une échelle $j = 4$ et des orientations $L = 6$ des filtres.

3.3.2 Classification

Les caractéristiques texturales (3D et 2D) basées sur LBP, GLCM et la transformée en scattering, sont calculées pour chaque image simulée et réelle dans l'espace conventionnel et spectral de Fraunhofer. Ensuite, les espaces des caractéristiques de GLCM 3D, de LBP, de LBP-TOP et de scattering transform 2D et 3D ont été réduits à 14 caractéristiques (équivalant au nombre minimum de caractéristiques pour la méthode GLCM 2D), en appliquant une analyse en composantes principales (PCA). Pour la tâche de classification, un classifieur SVM avec un noyau linéaire a été utilisé pour l'apprentissage et la classification des cellules. Nous évaluons les performances pour chaque cas de différences de densité et de distribution des cellules simulées selon sept résolutions différentes définies par les valeurs de NA . Nous avons utilisé la méthode de validation croisée à 10-folds pour quantifier les performances de classification (équation (2.2)) des images simulées ainsi que des images réelles.

3.4 Résultats et discussion

3.4.1 Images simulées

3.4.1.1 Images 3D vs 2D

Les performances de classification entre les populations de cellules en fonction de l'ouverture numérique NA de l'objectif lorsque la densité et la distribution des marqueurs fluorescents changent sont comparées pour les images 3D versus 2D dans les panneaux A et B de la figure 3.5 respectivement. Globalement, les performances de classification des cellules basées sur les différences de densité et de distribution diminuent trivialement lorsque la résolution diminue (les petites valeurs de NA). Cependant, il est remarquable que cette baisse est très limitée (86 à 80 %) comme le montre la figure 3.5-B pour les différences de distribution des marqueurs et plus prononcée (90 à 60 %) pour un changement de densité des marqueurs comme le montre la figure 3.5-A. De plus, les performances de classification entre les images 2D et 3D sont similaires lorsque le GLCM et la transformée en scattering sont utilisés pour les deux cas de différences d'organisation spatiale. Alors que pour le LBP, un écart a été trouvé lorsque les valeurs de NA augmentent. Cependant, en raison de la PSF allongée du microscope confocal le long de l'axe z , la différence observée est à nouveau très limitée ($\approx 8\%$). Les résultats obtenus permettent de définir la dimension d'image, la valeur de NA et l'espace de caractéristique qui donne la meilleure performance de classification, ce qui est le cas du LBP 3D (LBP-TOP) pour $NA > 1$. Également, ils montrent la possibilité d'utiliser la transformée en scattering pour toutes les valeurs de NA pour la classification des images 2D du plan focal au lieu de 3D en profitant du coût d'acquisition et de calcul plus faible des images 2D.

3.4.1.2 Espace spatial vs Fraunhofer

Les performances de classification pour les deux cas de différences de l'organisation spatiale des marqueurs fluorescents en fonction de NA sont ensuite comparées pour l'imagerie diffractive (spectrale) et l'imagerie conventionnelle (spatiale) dans les panneaux A et B de la figure 3.5 respectivement. Globalement, les performances de classification dans l'espace spectral s'avèrent très dépendantes de l'organisation spatiale des marqueurs comme trouvé pour l'espace spatial. Dans le cas des différences de densité, les performances chutent en passant de la haute à la basse résolution (valeurs grandes de NA vers des valeurs plus petites), alors que dans le cas de la différence de distribution, elles restent stables pour toutes les valeurs de NA . En ce qui concerne la question de l'espace de représentation, les performances dans l'espace diffractif

de Fraunhofer surmontent globalement celles de la microscopie spatiale, notamment pour les espaces texturales de GLCM et transformée en scattering, quelle que soit la résolution de la microscopie pour le cas de la différence de densité des marqueurs (figure 3.5-A). Par contre, les performances de l'espace diffractif sont inférieures pour le LBP et GLCM et similaires pour la transformée en scattering à ceux de l'espace spatial dans le cas de la différence de distribution des marqueurs (figure 3.5-B). Ces résultats montrent que l'imagerie diffractive de Fraunhofer pourraient constituer une solution optimale pour le tri de cellules en utilisant l'espace des caractéristiques texturales basé sur la transformée en scattering.

3.4.2 Images réelles

En complément des images synthétiques, nous avons appliqué les mêmes approches sur un ensemble d'images microscopiques réelles de cellules mammaires saines et cancéreuses (figure 3.1) acquises avec un microscope confocal en utilisant un objectif à immersion d'huile de 63x, $n = 1.51$, $NA = 1.4$ (voir la description des données dans le chapitre 2, section 2.3). Pour ce test, les volumes des images 3D et les images 2D situées au plan focal de l'objectif (tranches au milieu des piles 3D) sont utilisés pour la comparaison entre la classification 3D/2D. Le module de la transformée de Fourier des images 2D réelles est calculé pour créer l'ensemble de données d'imagerie diffractive pour la comparaison des espaces spatial/spectral. La quantité totale de l'ensemble de données réelles est d'environ 907 images de cellules cancéreuses et 1007 images de cellules saines pour chaque approche étudiée.

Nous avons utilisé les mêmes espaces des caractéristiques texturales appliqués sur les données simulées et nous avons également inclus une méthode basée sur un réseau de neurones convolutif (CNN, pour *Convolutional Neural Network*) [201]. L'architecture et les hyperparamètres du CNN ont été optimisés pour les images spatiales et spectrales. Le modèle est composé de 4 couches convolutionnelles utilisant des filtres 3×3 (32, 68, 128 et 128 filtres) suivies d'une activation RELU et d'un max-pooling. Pour la classification, nous avons utilisé deux couches denses de 128 et 64 neurones respectivement et 2 neurones avec une fonction softmax à la sortie. Les images d'entrée sont normalisées à des valeurs comprises entre 0 et 1. Nous avons également utilisé l'augmentation aléatoire des données avec : rotation jusqu'à 180° , zoom avant/arrière jusqu'à 20% et changement de luminosité jusqu'à 30% de l'original. L'ensemble de données ont été divisés en 80% pour l'apprentissage et 20% pour la validation. Chaque modèle a été entraîné pendant 100 époques, incluant la régularisation avec l'arrêt prématuré (early stopping), sur son jeu de données (2D spatial ou spectral) avec une taille de lot (*Batch size*)=32,

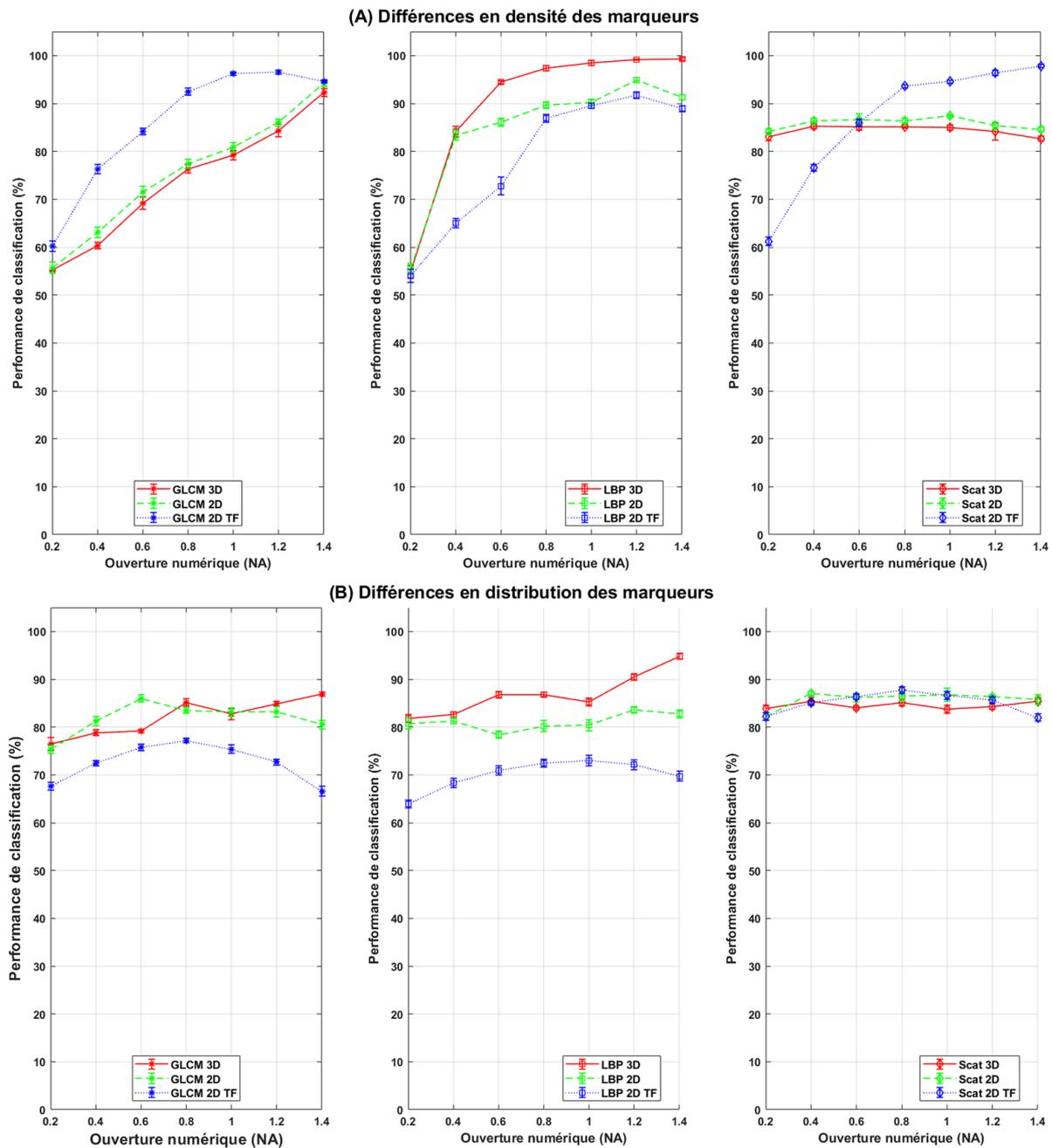


FIGURE 3.5 – Performance de classification des cellules pour les images 3D et 2D dans l’espace spatial, et 2D dans l’espace spectral de Fraunhofer calculé comme le module de la transformée de Fourier (TF) en fonction de l’ouverture numérique (NA) de l’objectif. (A) Lorsque la densité des marqueurs fluorescents change (Expérience 1, section 3.2.3). (B) Lorsque la distribution des marqueurs fluorescents change (Expérience 2, section 3.2.3).

un optimiseur Adam avec un taux d’apprentissage de $lr = 0.001$. Nous avons aussi utilisé l’entropie croisée catégorielle éparsée (SCCE, pour *Sparse Categorical Cross-Entropy*) comme une fonction de perte et la précision de la classification (équation (2.2)) comme

métrique pour l'évaluation de la performance. La fonction de perte SCCE est définie comme suit,

$$SCCE = \frac{-1}{N} \sum_{i=0}^N \sum_{c=0}^C \mathbf{1}_{y_i \in C_c} \log(P[y_i \in C_c]) , \quad (3.7)$$

avec, N est le nombre total des images (observations), C le nombre des classes, $\mathbf{1}$ est une fonction indicatrice, tel que $\mathbf{1} = 1$ si $y_i \in C_c$ et $\mathbf{1} = 0$ sinon. P est la probabilité prédite de l'appartenance de l'observation i à la classe c .

Le tableau 3.2 montre les résultats de classification pour les différentes approches étudiées. Les performances de classification des images en 3D et 2D, ont le même comportement que celui trouvé pour les données synthétiques (voir figure 3.5, pour $NA = 1.4$), où les performances sont proches pour les espaces de caractéristiques texturales GLCM et la transformée en scattering, et une importante différence (de 8%) pour le LBP. Ceci démontre la possibilité pour une telle tâche de classification binaire d'utiliser des images 2D situées au niveau du plan focal de l'objectif au lieu de manipuler des images 3D qui sont coûteuses en acquisition et en traitement comme le montre le tableau 3.3.

Concernant les espaces spatiaux et spectraux, globalement, l'espace spectral produit des performances assez similaires à l'espace spatial lorsque des méthodes texturales standards sont utilisées. Les meilleurs résultats dans le domaine spectral sont obtenus avec la transformée en scattering. Pour le CNN, une performance de classification légèrement supérieure pour l'espace spatial est observée, avec toutefois une différence limitée à quelques pourcents en comparaison avec l'espace spectral. Par conséquent, l'imagerie diffractive de Fraunhofer pourrait constituer une solution optimale pour cette tâche de tri cellulaire lorsque l'espace des caractéristiques texturales est optimisé, en prenant comme avantage la conception optique simple de l'imagerie diffractive de Fraunhofer et donc de la technique d'imagerie sans lentille.

TABLEAU 3.2 – Résultats de la classification des méthodes utilisées pour les images 3D et 2D dans le domaine spatial et pour les images 2D dans le domaine spectral de Fraunhofer.

Espaces	Dimensions	Méthodes			
		GLCM	LBP	Scatnet	CNN
Spatial	3D	72.2 ± 1.1%	73.8 ± 0.9%	75.1 ± 0.5 %	-
	2D	71.1 ± 0.6%	65.9 ± 1.4 %	73.3 ± 0.6 %	79.4 ± 1.7%
Spectral	2D	73.6 ± 0.8%	70.1 ± 1.1%	74.1 ± 1.2%	76.5 ± 1.4%

TABLEAU 3.3 – Nombre et temps de calcul pour l'extraction des caractéristiques pour les images 2D et 3D avant la réduction de dimensions avec une PCA. Le temps est moyenné sur 100 images réelles.

Paramètres	Caractéristiques						
	2D				3D		
	GLCM	LBP	SCATNET	CNN	GLCM	LBP	SCATNET
Nombre de caractéristiques	14	59	241	3 460 034	182	768	723
Temps d'extraction (en seconde)	0.02	0.01	0.06	0.008	2.9	0.5	0.12

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié différentes approches de microscopie de fluorescence afin d'optimiser les coûts pour le tri de cellules. Nous avons comparé les performances entre les images 3D du microscope confocal et les images 2D situées au plan focal de l'objectif du microscope pour une tâche de classification binaire. Nous avons également comparé la même tâche entre l'imagerie spatiale conventionnelle et l'imagerie diffractive de Fraunhofer calculée comme le module de la transformée de Fourier des images 2D spatiales. Pour réaliser ces comparaisons, nous avons généré des images de cellules uniques simulées, imitant les cellules saines et pathologiques, avec des marqueurs fluorescents ayant une faible différence dans l'organisation spatiale en termes de densité et de distribution des marqueurs. Une PSF 3D théorique approximée par un noyau gaussien 3D a été modélisée. Avec ce modèle, différentes résolutions latérales et axiales ont été simulées en variant la valeur de l'ouverture numérique NA de l'objectif de microscope. Appliquée aux mêmes espaces de caractéristiques et au même classifieur, cette comparaison a permis d'identifier des situations non-triviales où le traitement des images 2D spatiales situées au plan focal d'un microscope pourrait être optimal par rapport au traitement de tout le volume 3D des images. De plus, elle a permis de montrer que les figures de diffraction de Fraunhofer pourrions être utilisées pour une classification des cellules avec une magnitude plus élevée à celle de l'espace spatial. Également, la comparaison a montré les valeurs de NA (objectif de microscope) et les méthodes texturales optimales qui permettent d'avoir une meilleure performance de classification et de réduire l'écart entre les différentes approches testées.

Ensuite, nous avons validé les résultats obtenues par la simulation avec un ensemble d'images réelles acquises par un microscope confocal associée à un objectif à immersion d'huile et d'ouverture numérique $NA = 1.4$. Les résultats sur les données réelles ont été trouvés conforme avec ceux obtenus par la simulation pour les différentes approches. Par conséquent, ces résultats prouvent, d'un côté, la possibilité d'utiliser les images 2D

situées au plan focal au lieu des images 3D, et d'un autre côté, la possibilité d'utiliser les images 2D dans l'espace de Fraunhofer au lieu des images 2D spatiale afin de réduire le coût du microscope sans l'utilisation de l'objectif. Ces résultats sont très intéressants d'un point de vue du traitement d'images, car les images 3D sont plus coûteuses en acquisition et en traitement que les 2D. De plus, ils sont importants de point de vue physique, car ils ouvrent des nouvelles voies pour une cytologie rapide et peu coûteuse où le tri des cellules peut être basé sur les figures de diffraction sans avoir besoin de microscopes coûteux en terme d'optiques.

Dans cette étude, les images réelles ont été acquises avec microscope confocal à un objectif d'ouverture numérique $NA = 1.4$. Il serait intéressant de tester d'autres données réelles avec différentes valeurs d'ouvertures numériques. De plus, la simulation de l'imagerie diffractive a été volontairement simple pour une première démonstration d'intérêt. Il serait encore intéressant d'étudier différentes distances d'acquisition allant du régime de diffraction de Fraunhofer correspondant au champ lointain jusqu'au régime de diffraction de Fresnel connu comme le champ proche [202, 203]. Également, la méthodologie proposée pourrait être transposée sans aucune difficulté à tout type de PSF réaliste. Dans ce chapitre, la microscopie confocale a été utilisée comme microscope 3D. Ce microscope fonctionne dans un régime sous-résolu et ne peut pas distinguer individuellement les marqueurs fluorescents. Il serait intéressant de revoir cette étude avec des microscopes super-résolus incluant des modèles de PSF réalistes et un post-traitement, tels que le microscope par localisation de molécules uniques [204, 205], le microscope à illumination structurée [206] ou encore le microscope à fluorescence à feuillet de lumière (LSFM) [207]. Aussi, le bruit de la caméra, tel que le bruit thermique, de lecture et de photon, et l'effet de la microfluidique, généralement la base de la cytométrie rapide, n'étaient pas simulés et étudiés dans ce chapitre. Il serait intéressant d'ajouter un tel artefact sur les images simulées et d'étudier l'effet de flou de la microfluidique sur l'analyse des images, notamment l'influence de la vitesse des cellules sur la performance de classification. Une telle étude est présentée dans le chapitre suivant et la simulation de toutes les techniques de microscopie proposés ont été regroupées dans un outil de simulation et d'analyse des images (MicroVIP) décrit dans l'annexe C.

Effet de la microfluidique sur le tri de cellules uniques

Sommaire du présent chapitre

4.1 Introduction	76
4.2 Acquisition des images	76
4.3 Simulation d'images de cellules uniques par LSFM	78
4.3.1 Nuage de points 3D de marqueurs fluorescents (P_c)	79
4.3.2 Fonction d'étalement du point expérimentale (PSF 3D)	81
4.3.3 Simulation des artefacts microfluidiques (η)	81
4.3.4 Simulation du bruit de la caméra : (β)	82
4.3.5 Images de cellules uniques 3D simulée (I_{LSFM})	82
4.4 Analyse d'images	83
4.4.1 Extraction des caractéristiques texturales et classification	83
4.4.2 Débruitage d'images	84
4.5 Résultats et discussion	86
4.5.1 Analyse d'images simulées	86
4.5.2 Analyse d'images réelles	87
4.6 Conclusion	92

4.1 Introduction

Dans les chapitres précédents (chapitre 2 et 3), nous avons montré la faisabilité du tri de cellules uniques stables (fixes) avec des images 2D sous-résolues, en utilisant des caractéristiques texturales. Cependant, des effets spécifiques à la microfluidique, non étudiés dans les chapitres précédents, sont le flou causé par le mouvement des cellules pendant l'acquisition de l'image et la réduction du nombre de tranches z 3D acquises pour une cellule. Il est intéressant d'étudier l'influence de ce type de bruit sur l'efficacité de la classification des images de cellules. Dans ce chapitre, nous étendons ces travaux en ajoutant un tel flou. Nous étudions l'influence des artefacts de mouvement des cellules dans le circuit microfluidique sur la qualité de l'image, sur la performance de la classification des cellules en 2D et 3D basée sur des caractéristiques texturales et aussi sur l'efficacité de débruitage basée sur des algorithmes d'apprentissage profond. Ainsi, nous optimisons la vitesse de passage des cellules dans le microcanal et les dimensions des images pour avoir une acquisition rapide en respectant un tri de cellules à haute performance. Nous proposons d'étudier ces aspects avec des images simulées ainsi qu'avec des images de cellules uniques réelles acquises avec un microscope microfluidique de fluorescence à feuillet de lumière. Ce dispositif a été développé dans le cadre du projet PROCHIP et les descriptions de ce dispositif sont montrés dans la section 1.7.3.1 du chapitre 1).

Le présent chapitre est organisé comme suit. L'acquisition des images réelles avec le microscope microfluidique à feuillet de lumière est d'abord montrée. Puis, la simulation des images et les méthodes de classification et de débruitage des images utilisées dans l'étude sont données. Finalement, nous montrons les résultats des analyses sur les images simulées et réelles et nous finissons par une conclusion.

4.2 Acquisition des images

Les cellules utilisées dans cette étude sont des cellules épithéliales mammaires humaines fixées (WT) et des cellules tumorales primaires dérivées de xénogreffes (XD). De plus, la lignée cellulaire XD a été insérée dans un hôte vivant (une souris) afin de générer des métastases et des tumeurs secondaires. Ces dernières ont été récupérées et cultivées séparément, obtenant ainsi une troisième lignée cellulaire, dite dérivée de métastases (MD). Les trois types de cellules ont été marqués pour exprimer la protéine fluorescente mCherry (Longueur d'onde d'émission centrale $\lambda_{em} = 610 \text{ nm}$) en correspondance avec l'histone H2B, à l'intérieur du noyau [130]. Finalement, afin d'éviter l'agrégation des cellules et le colmatage éventuel du système microfluidique, de l'acide éthylènedia-

mine tétra-acétique (EDTA) à une concentration de 5 *mmol* a été ajouté aux échantillons.

Les cellules utilisées ont un diamètre de noyau typique compris entre 10 et 15 μm . Compte tenu de ces dimensions et de nombre cible de segments par cellule compris entre 5 et 25, cela implique un régime d'écoulement de l'ordre de 20 à 140 *nl/min*, bien en dessous du seuil du nombre de Reynolds pour un écoulement laminaire. Ce régime d'écoulement particulier devrait garantir l'absence de vortex dans le liquide, c'est-à-dire, en première approximation, une translation rigide de la cellule le long du canal, c'est-à-dire dans la direction perpendiculaire à la nappe lumineuse et au plan de détection. Néanmoins, des perturbations induites par les parois latérales ou par des imperfections dans la section transversale du canal, ainsi que des mouvements browniens peuvent encore avoir lieu.

Les échantillons sont imagés à l'aide d'un objectif à immersion dans l'eau 60x $NA = 1.1$ (Olympus LUMFLN60XW), de sorte que le FOV est représenté sur le capteur de la caméra (CMOS, Hamamatsu Orca Flash 4.0 V3, taille d'un pixel de 6.5 μm) avec un facteur de conversion de 0.11 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Les échantillons sont transportés à une vitesse donnée (standard : 50 *nl/min* et rapide : 140 *nl/min*) à la feuille de lumière, mesurée avec un débitmètre en ligne, tandis que la caméra fonctionne en mode d'acquisition continue. Durant le passage de la cellule, un logiciel sélectionne la sous-région d'intérêt et combine les images acquises par la caméra dans une matrice 3D de 200×200 pixels avec un nombre variable de tranches z et les enregistre dans un fichier HDF5 dédié. Dans ce mode d'opération, la dimension z des données 3D, c'est-à-dire la distance d_z entre chaque plan z (en μm), est donnée par,

$$d_z = \frac{Q}{A \text{ frame rate}}, \quad (4.1)$$

où Q représente la vitesse des cellules (débit mesuré), A est la section transversale du microcanal ($5646 \mu\text{m}^2$) et *frame rate* est la fréquence d'acquisition maximale exploitable de la caméra (200 *Hz*).

Les descriptions des images de cellules réelles WT, XD et MD acquises avec les vitesses standard et rapide sont présentées dans le tableau 4.1. Il est important de noter que les ensembles de données à vitesse rapide ont un échantillonnage très faible suivant l'axe z (c.-à-d. un petit nombre de tranches z), presque un tiers de la contrepartie à vitesse standard. La figure 4.1 illustre les projections maximales en z et en x (plans XY et YZ) des images de cellules WT réelles. Comme le montrent les plans YZ des cellules, il est visible que le niveau de flou de mouvement augmente avec la vitesse

des cellules. De plus, comme le montre la figure 4.2, le nombre de coupes z acquises avec la vitesse rapide est beaucoup plus petit que le nombre de tranches acquises avec la vitesse standard. Il est donc intéressant d'explorer l'effet de ces distorsions sur les performances du tri cellulaire.

TABLEAU 4.1 – Nombre d'images et gamme de tranches z et espacement z (d_z) (en μm) des images réelles des types de cellules WT, XD et MD utilisées dans l'étude pour des vitesses cellulaires standard (50 nl/min) et rapide (140 nl/min).

Vitesse	Nombre d'images			Tranches z	d_z (μm)
	WT	XD	MD		
Standard	1450	1606	2085	[5 25]	0.74
Rapide	1380	2236	1890	[2 9]	2.1

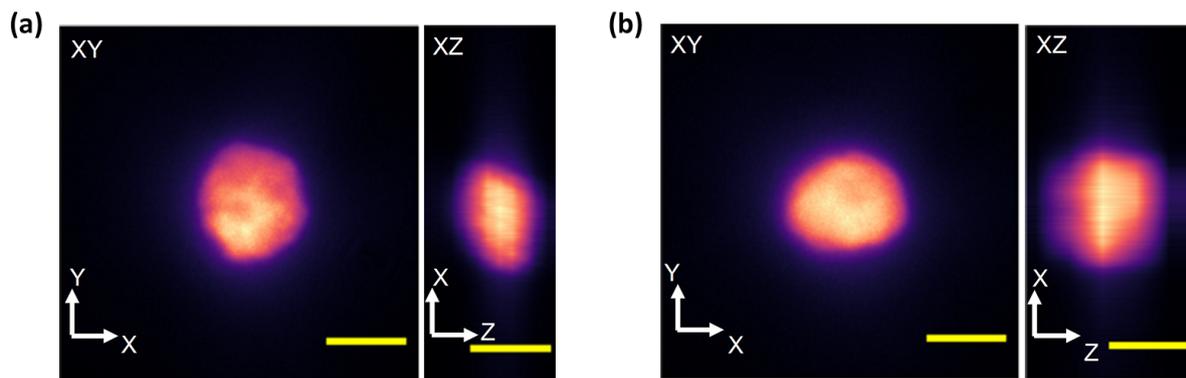


FIGURE 4.1 – Illustration des plans XY et YZ des images de microscopie microfluidique à feuillet de lumière de cellules WT. (a) La cellule a été acquise avec une vitesse de cellule standard de 50 nl/min . (b) La cellule a été acquise avec une vitesse de cellule rapide de 140 nl/min . La taille XY des images est de 200×200 pixels ($22 \times 22 \mu m$) et l'espacement z est de $0,74 \mu m$ pour (a) et de $2,1 \mu m$ pour (b). Le niveau de l'effet de flou est visible dans les plans YZ des panneaux (a) et (b). Barre d'échelle jaune = $5 \mu m$.

4.3 Simulation d'images de cellules uniques par microscopie microfluidique à feuillet de lumière

Afin d'étudier l'impact de la microfluidique sur l'analyse d'images de cellules uniques, nous proposons d'abord de baser l'étude sur des images de cellules simulées. La simulation de l'ensemble des images acquises par microscopie microfluidique à

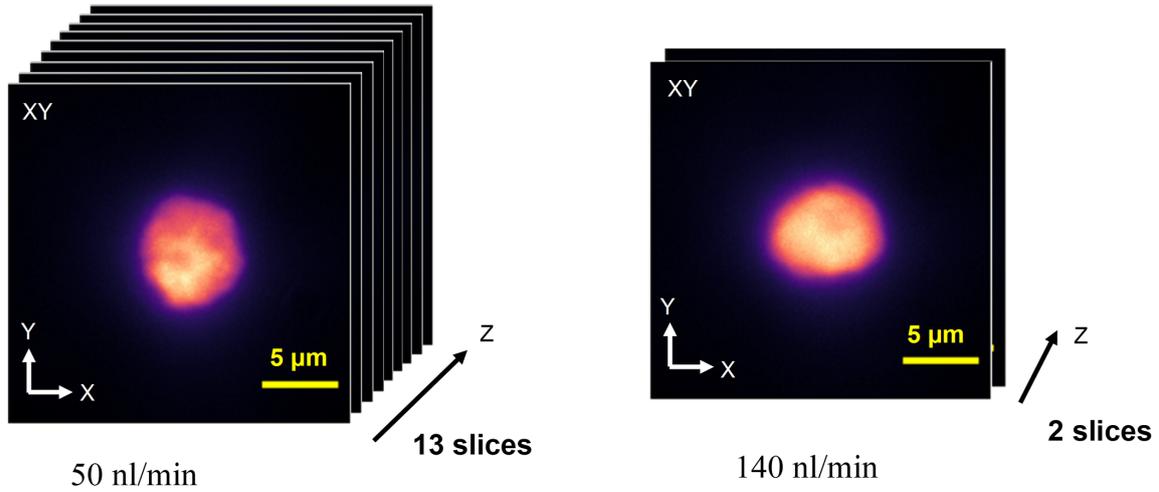


FIGURE 4.2 – Effet de microfluidique sur le nombre des tranches z acquises pour une image. Le nombre de tranches z (13) acquises avec une vitesse de cellule de 50 nl/min par comparaison au nombre de tranches z (2) acquises avec une vitesse de cellule de 140 nl/min pour deux cellules de taille similaire.

feuille de lumière est réalisée selon l'équation suivante,

$$I_{LSFM} = \{(P_C * PSF) * \eta(\sigma_m, \theta_m)\} + \beta, \quad (4.2)$$

où "*" indique une convolution, I_{LSFM} est l'image microscopique 3D synthétique, P_C est le nuage de points 3D des marqueurs fluorescents, PSF est la fonction d'étalement du point expérimentale du microscope de fluorescence à feuille de lumière. Les artefacts microfluidiques ont été simulés sous la forme d'un noyau de flou de mouvement convolutif (η) de taille σ_m qui dépend de la vitesse de passage des cellules dans le microcanal et de l'orientation des cellules θ_m . $\beta = \{G, P\}$ est le bruit de la caméra, tel que G est un bruit gaussien simulant le bruit thermique et de lecture et P un bruit de Poisson simulant le bruit de photon. La figure 4.3 montre un résumé graphique de la simulation et les éléments de l'équation (4.2) sont décrits dans ce qui suit.

4.3.1 Nuage de points 3D de marqueurs fluorescents (P_C)

Dans cette étude, les images 3D de microscopie microfluidique de cellules uniques sont générées à l'aide d'un simulateur réaliste basé sur la modélisation des chaînes de chromatines en 3D [192] (voir description dans la section 3.2.1 du chapitre 3). Les chaînes de chromatine sont ensuite interpolées dans les directions x, y et z afin de simuler aléatoirement plusieurs formes sphériques de cellules allant de $8 \times 8 \times 10 \mu m^3$ à $12 \times 12 \times 15 \mu m^3$. Nous avons utilisé ces chaînes 3D comme supports pour les marqueurs

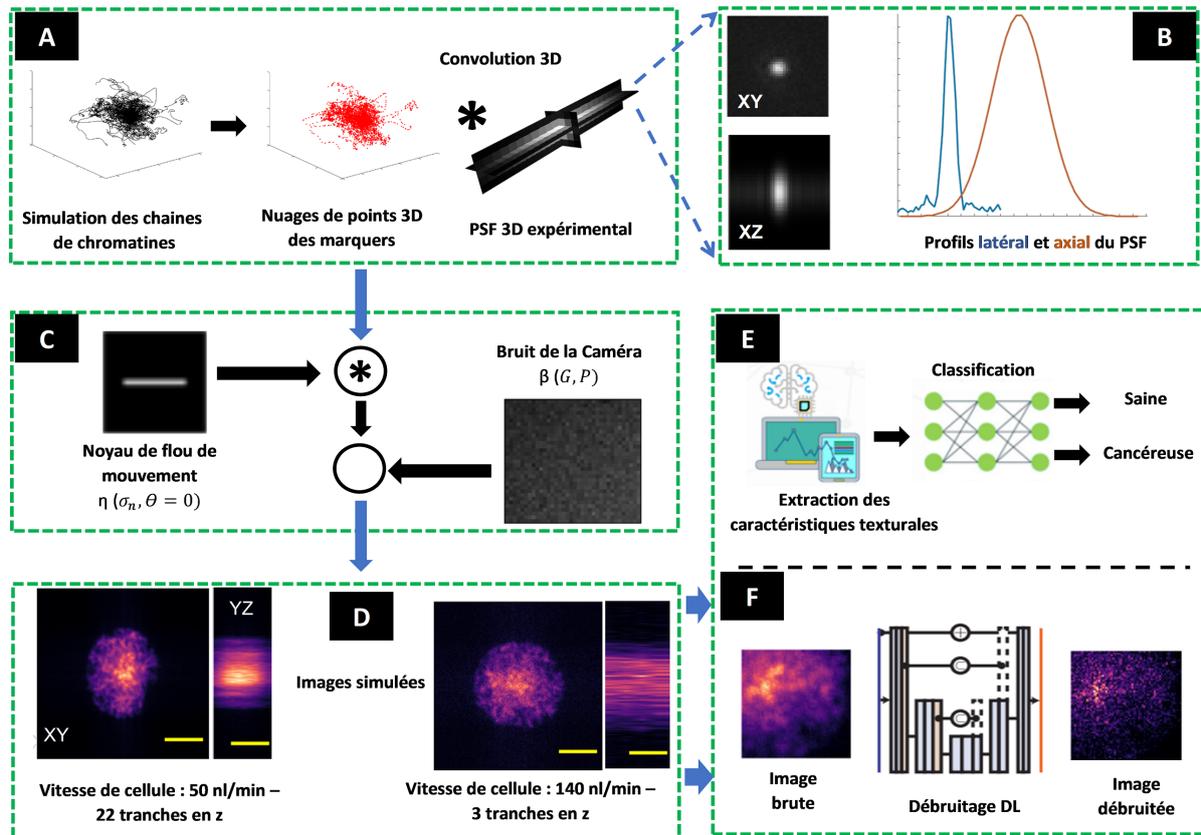


FIGURE 4.3 – Pipeline global de la simulation. (A) Simulation des chaînes de chromatine 3D avec diverses configurations spatiales. Les marqueurs fluorescents sont générés aléatoirement en utilisant une distribution uniforme sur les chaînes formant un nuage de points 3D. Ensuite, une étape de convolution est appliquée avec la PSF 3D expérimentale du microscope à feuille de lumière. (B) Profils latéral et axial de PSF expérimentale utilisée. (C) Effets de la microfluidique simulés comme un noyau de flou de mouvement convolué avec les images synthétiques 3D. Le bruit de la caméra a ensuite été ajouté (D) Pour générer les images synthétiques 3D finales des cellules uniques imitant les cellules acquises avec un microscope à feuille de lumière dans un système microfluidique avec différentes vitesses cellulaires. E) Les caractéristiques texturales sont extraites des images 3D et 2D et sont ensuite utilisées pour classer les cellules saines et cancéreuses. (F) Les images 3D avec leur vérité terrain ont été utilisées pour entraîner les modèles de débruitage par apprentissage profond (CARE) qui seront appliqués ensuite aux images réelles. Barre d'échelle = $5 \mu m$.

fluorescents qui sont distribués le long des chaînes où la distance entre deux marqueurs fluorescents successifs suit une distribution uniforme (U). La combinaison de ces deux étapes génère un nuage de points 3D de marqueurs fluorescents simulant l'ADN dans le volume cellulaire, qui est ensuite convolué avec le PSF 3D expérimental, comme illustré dans la figure 4.3-A.

4.3.2 Fonction d'étalement du point expérimentale (PSF 3D)

Pour augmenter le réalisme de la simulation, nous avons utilisé la PSF 3D expérimentale du microscope de fluorescence à feuillet de lumière couplé avec un système microfluidique (décrit dans la section 1.7.3.1 du chapitre 1). La PSF expérimentale de $4 \times 4 \times 9.2 \mu m^3$ a été obtenue avec un objectif 60x NA=1.1 à immersion dans l'eau (indice de réfraction $n = 1.33$) en utilisant des nanoparticules fluorescentes ponctuelles avec une longueur d'onde d'émission centrale de $\lambda = 580 \text{ nm}$ (voir figure 4.3-B). Afin de déterminer les résolutions latérale et axiale du microscope, la PSF 3D a été ajustée avec une fonction Gaussienne dans les directions xy et z et les largeurs à mi-hauteur dans les directions latérale ($FWHM_r$) et axiale ($FWHM_z$) ont été calculées comme suit,

$$FWHM_{r,z} = 2.335\sigma_{r,z}, \quad (4.3)$$

où, $\sigma_{r,z}$ représente les largeurs Gaussiennes latérale et axiale ajustées aux profils de PSF expérimentale. Les résolutions latérale et axiale calculées sont respectivement de $FWHM_r = 0.521 \mu m$ et $FWHM_z = 2.415 \mu m$. Cette PSF a été convoluée avec le nuage de points 3D pour générer les volumes d'images synthétiques de cellules uniques.

4.3.3 Simulation des artefacts microfluidiques (η)

Les artefacts microfluidiques ont été simulés sous la forme d'un noyau de flou de mouvement convolutif $\eta(\sigma_m, \theta_m)$ appliqué sur les plans YZ des images générées en 3D (figure 4.3-C). La taille σ_m du flou de mouvement dépend de la vitesse des cellules (Q) à l'intérieur du microcanal et des caractéristiques de la caméra telles que la fréquence d'acquisition d'images (frame rate) et la vitesse d'obturation VO (shutter speed). La taille du noyau dans l'espace du microcanal (en μm) est calculée comme suit,

$$\sigma_m(\text{en } \mu m) = Q \times VO. \quad (4.4)$$

La taille du noyau dans l'espace de l'image (en pixels) peut être dérivée par $\frac{\sigma_m}{d_z}$, où d_z est l'espacement en direction z qui est défini dans l'équation (4.1). Selon cette simulation, la taille du noyau de flou de mouvement (σ_m) et le nombre de tranches z des images simulées sont proportionnels et inversement proportionnels à la vitesse de la cellule Q . Dans notre simulation, la fréquence d'acquisition d'images de la caméra a été fixée à 200 Hz et la vitesse d'obturation à $\frac{1}{\text{frame rate}}$, les mêmes utilisées pour l'acquisition des images réelles. L'orientation θ_m du noyau de flou de mouvement a été fixée à $\theta_m = 0^\circ$ en considérant que la rotation des cellules à l'intérieur du dispositif microfluidique est négligeable.

4.3.4 Simulation du bruit de la caméra : (β)

Pour plus de réalisme, nous avons simulé également un bruit thermique et de lecture et un bruit de photon de la caméra sous forme du bruit gaussien $G(\mu_n, \sigma_n)$ et de bruit de Poisson $P(\lambda_p)$ respectivement (figure 4.3-C). Les paramètres du bruit gaussien ont été calculés en ajustant la distribution d'intensité du fond des images réelles. Par calcul, nous avons trouvé une valeur de la moyenne μ_n se situe dans la plage de [110, 140] et l'écart-type (σ_n) dans la plage de [5, 15]. La fréquence λ_n du paramètre de bruit de Poisson, généralement proportionnel au nombre de photons collectés, a été fixée aléatoirement à $\lambda_n = 100$.

4.3.5 Images de cellules uniques 3D simulée (I_{LSFM})

Les résultats du schéma de simulation de l'Eq. (4.2) sont les images de microscopie à fluorescence à feuillets lumineux 3D (I_{LSFM}) rapportées dans la Fig 4.3.D. Les images ont été simulées avec une taille de 200×200 pixels correspondant à $22 \times 22 \mu m^2$ pour une résolution xy des pixels de $0,11 \mu m$, tandis que le nombre de tranches z a été défini en fonction du débit de l'échantillon dans le système, dans la plage de 20 à 140 nl/min ($\frac{Q}{60 \times A}$ en $\mu m/sec$, avec $A = 5646 \mu m^2$ est la surface de la section transversale du microcanal. Pour cette gamme de vitesses et de volumes cellulaires, les valeurs d'espacement z (d_z) récupérées sont comprises entre 0,29 et $2,1 \mu m$. Pour les cellules 3D simulées, le nombre de tranches z acquises est de l'ordre de [20 50] tranches pour une vitesse cellulaire de 20 nl/min et de [3 7] tranches pour 140 nl/min . Enfin, des images 2D ont été simulées en appliquant une transformation de projection de somme sur z des images de microscopie synthétique 3D.

Une illustration des images simulées à différentes vitesses cellulaires est présentée dans la Figure 4.4. Sur cette figure, l'effet du flou de mouvement des cellules en microfluidique sur la qualité des images simulées et la diminution du nombre de tranches z acquises sont visibles lorsque la vitesse des cellules augmente.

Nous avons généré 5 séries de 2000 images chacune pour différentes vitesses des cellules, telle que 1000 images de cellules saines et 1000 de cellules cancéreuses. Les deux classes des cellules ont été basées sur les différences en densité des marqueurs fluorescents en changeant le paramètre de la distribution uniforme utilisée pour générer le nuage de points 3D. Alors, nous avons fixé $U_h(0, 20)$ pour les cellules saines, et $U_{unh}(0, 30)$ pour les cellules cancéreuses.

Les cellules générées ont été utilisées pour une tâche de classification afin d'étudier l'effet de la microfluidique sur les performances de classification (figure 4.3-E) et ont

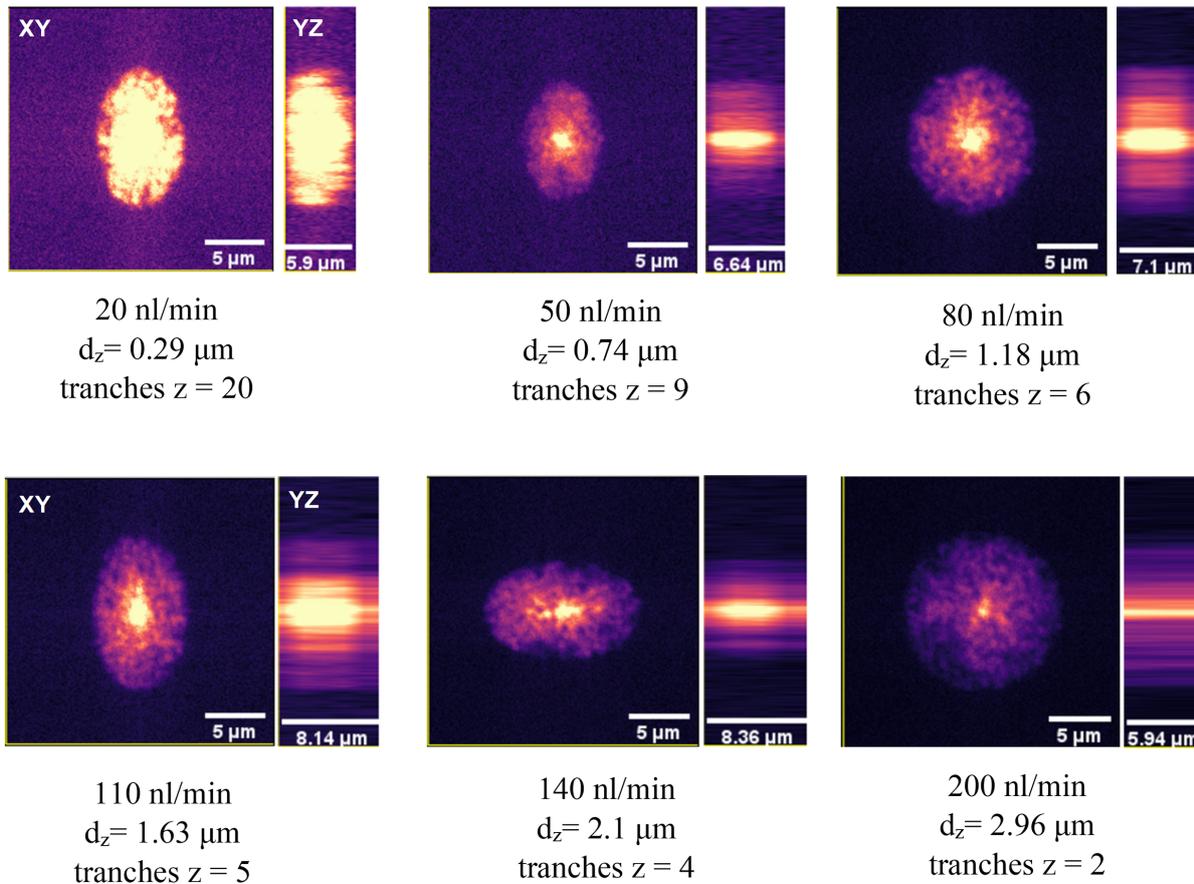


FIGURE 4.4 – Illustration des plans XY et YZ situés au centre des images simulées en fonction de la vitesse de cellules dans les microcanaux du système microfluidique. Les images montrées sont les plans XY et YZ de chaque image 3D simulée avec la distance inter-tranche (d_z) et le nombre des tranches acquis pour chaque image pour différentes vitesses de cellules. L'effet de la microfluidique est caractérisé par la diminution du nombre des tranches z et l'augmentation du flou de mouvement sur les plans YZ lorsque la vitesse des cellules augmente.

également été utilisées pour l'augmentation des données afin d'entraîner un algorithme de débruitage par apprentissage profond (figure 4.3-F).

4.4 Analyse d'images

4.4.1 Extraction des caractéristiques texturales et classification

Afin d'étudier les effets de la microfluidique sur la classification des cellules. Nous avons basé la classification sur des espaces de caractéristiques texturales 2D et 3D classiques, sont le LBP, GLCM et la transformé en scattering (scattering transform) suivis d'un classifieur SVM avec un noyau cubique. Les paramètres de ces méthodes ont été optimisés empiriquement, d'une manière à maximiser la performance de classification.

Pour cela, nous avons fixé les paramètres de voisinage à 16 pixels pour le LBP et GLCM, tandis que le nombre de couches, des échelles et les orientations des filtres de Gabor de la transformée en scattering ont été fixés à $m = 2$, $j = 4$ et $L = 8$ respectivement. Pour évaluer la performance, la méthode de la validation-croisée à 10-folds a été utilisée pour la classification des images simulées ainsi que les images réelles. Le déséquilibre de nombre des classes des images réelles est régularisé en prenant un nombre d'images de chaque classe (WT, XD et MD) équivalent à la plus petite base de données d'un type de cellules pour chaque vitesse de cellule, c.à.d., 1450 images de chaque type de cellule pour la base de données de vitesse standard et 1380 pour la base de données de vitesse rapide.

4.4.2 Débruitage d'images

4.4.2.1 CARE

Le débruitage, i.e. deconvolution des images est proposé à l'aide d'une méthode d'apprentissage profond pixel par pixel basée sur l'algorithme de restauration d'image (CARE, pour *Content-Aware image Restoration*) [68]. CARE est basé sur l'architecture de réseau neuronal convolutif (CNN) Unet [208]. Dans sa mise en œuvre originale, CARE utilise des paires d'images avec des niveaux de bruit élevés (Image brute, *Raw*) et faibles (Vérité terrain, *GT*) pour générer des réseaux de débruitage spécifiques aux données.

Dans notre étude, nous avons utilisé CARE pour débruiter les données réelles pour lesquelles la vérité terrain n'est pas disponible, en entraînant avec des paires d'images simulées (*Raw*, *GT*). Pour cela, nous avons généré un ensemble de 120 images synthétiques et leur *GT* pour chaque vitesse de cellule (50 et 140 *nl/min*). Chaque image a été divisée en 512 patches 3D, dont la taille est de $64 \times 64 \times 8$ pixels pour la vitesse standard des cellules, et de $64 \times 64 \times 4$ pour la vitesse rapide des cellules (voir figure. 4.6-A et -B). Le nombre total de patches de l'ensemble de données d'image pour chaque vitesse de cellule est de 66560, répartis en 80% pour l'entraînement et 20% pour la validation de l'architecture CARE. L'architecture et les hyper-paramètres de CARE ont été optimisés pour les deux ensembles de données (vitesse des cellules) et ont été utilisés comme suit : nombre des blocs d'Unet=2, taille des filtres= $3 \times 3 \times 3$, nombre de filtres=(32, 64), taille du lot (*batch size*)=64, nombre d'époques d'apprentissage=100 et taux d'apprentissage (*learning rate*)=0.0001. Nous avons utilisé l'erreur absolue moyenne (*mae*, pour *mean absolute error*) comme fonction de perte pendant l'apprentissage des modèles. Le *mae* est défini comme suit,

$$mae = \sum_{i=1}^N \frac{|\hat{Y}_i - Y_i|}{N}, \quad (4.5)$$

où, N est la taille 1D de l'image débruitée, \hat{Y}_i et Y_i sont les $i^{\text{ème}}$ valeurs scalaires prédites par CARE et les vraies valeurs de la GT respectivement.

Les modèles CARE entraînés sur les données simulées ont été directement appliqués pour le débruitage des données réelles. Et puisque les vérités terrains des images réelles ne sont pas disponibles, nous avons utilisé la performance (précision) de la classification et le rapport signal/bruit (SNR) pour évaluer la qualité de débruitage.

4.4.2.2 Noise2void

En plus de la méthode de débruitage basée sur CARE, nous avons également appliqué l'algorithme de débruitage Noise2void basé encore sur l'apprentissage profond [209]. Il s'agit d'une approche auto-supervisée qui élimine le besoin des vérités terrains (GT) comme le cas de nos données réelles. Noise2void permet de débruiter des images en n'ayant accès qu'à une seule image bruitée ou à un ensemble d'images en prédisant les valeurs des pixels centraux des patches données. Il est également basé sur une architecture convolutionnelle Unet qui apprendrait à sortir directement les valeurs des pixels centraux, laissant finalement l'image d'entrée inchangée. Ainsi, ces réseaux apprennent à supprimer le bruit indépendamment du niveau du pixel.

Nous avons entraîné un modèle Noise2void pour chacun des ensembles de données (de vitesse des cellules standard et rapide). Les images d'entraînement et de validation ont été divisées en patches de $64 \times 64 \times 4$ pour les deux bases de données en ne prenant que les images réelles ayant un nombre de tranches $z \geq 4$. Le nombre total de patches par ensemble de données est de 12384, répartis en 80% pour l'entraînement des modèles et 20% pour la validation. L'architecture et les hyper-paramètres de Noise2Void ont été également optimisés pour les deux ensembles de données et ont été utilisés comme suit : nombre des blocs d'Unet=2, taille des filtres= $3 \times 3 \times 3$, nombre de filtres=(32, 64), batch size=32, nombre d'époques d'apprentissage=100, learning rate=0.0004, rayon du voisinage=16 pixels et la fonction d'activation de la sortie est linéaire. Nous avons utilisé l'erreur quadratique moyenne (mse, pour *mean squared error*) comme fonction de perte pendant l'apprentissage des modèles. Le mse est défini comme suit,

$$mse = (s_i - \hat{s}_i)^2, \quad (4.6)$$

où, \hat{s}_i est la valeur du pixel central du $i^{\text{ème}}$ patch prédite par Noise2void et s_i est la valeur du même pixel central dans le $i^{\text{ème}}$ patch à l'entrée du modèle Noise2void.

Enfin, comme Noise2void n'a pas besoin d'images de références (GT), nous avons

entraîné l'architecture directement sur les images de données réelles. L'efficacité du débruitage a été évaluée par la moyenne du rapport signal/bruit (SNR) et la performance (précision) de la classification. Les résultats sont montrés dans la section suivante.

4.5 Résultats et discussion

4.5.1 Analyse d'images simulées

4.5.1.1 Classification des bases d'images simulées

Les performances (précision) de la classification entre les populations de cellules simulées avec des différences en densité des marqueurs fluorescents en fonction de la vitesse des cellules (Q) dans le microcanal sont comparées pour les images de microscopie 2D et 3D pour différents espaces de caractéristiques texturales dans la figure. 4.5. Globalement, les performances de classification sont stables pour toutes les vitesses des cellules, avec une augmentation limitée de la précision pour une vitesse cellulaire rapide lorsque la transformée en scattering 2D est utilisée. Concernant la question des dimensions de l'image, il faut noter que les performances entre les espaces 2D et 3D varient en fonction des caractéristiques texturales utilisées : le décalage est important pour le GLCM, mais très limité pour les méthodes de la transformée en scattering et de LBP. Ces résultats sur les données simulées montrent, premièrement que les artefacts microfluidiques ont un effet réduit sur les performances de classification, offrant ainsi la possibilité d'utiliser une vitesse de cellule rapide pour le tri cellulaire avec le montage microscopique étudié. Deuxièmement, l'écart limité entre les performances de classification 2D et 3D, lorsque la méthode optimale de caractéristiques texturales est utilisée, comme la transformée en scattering dans notre cas, permet l'utilisation d'images 2D et ouvre la voie à la cytométrie rapide en réduisant le temps d'acquisition et le temps de calcul.

4.5.1.2 Débruitage d'images simulées

Nous avons utilisé la similarité structurelle classique (SSIM, pour *Structural Similarity*) et l'erreur quadratique moyenne normalisée (NRMSE, pour *Normalized Root Mean Squared Error*) comme mesures pour évaluer la performance de CARE pour débruiter les données simulées telles qu'utilisées dans [68]. La figure 4.6-C montre les performances de débruitage en fonction des vitesses standard et rapide des cellules, calculées pour 20 images de test par classe de cellules et par vitesse (total de 40 images de test par vitesse). La performance de débruitage des données simulées montre l'efficacité de CARE pour les vitesses standard et rapide des cellules avec une performance légèrement meilleure

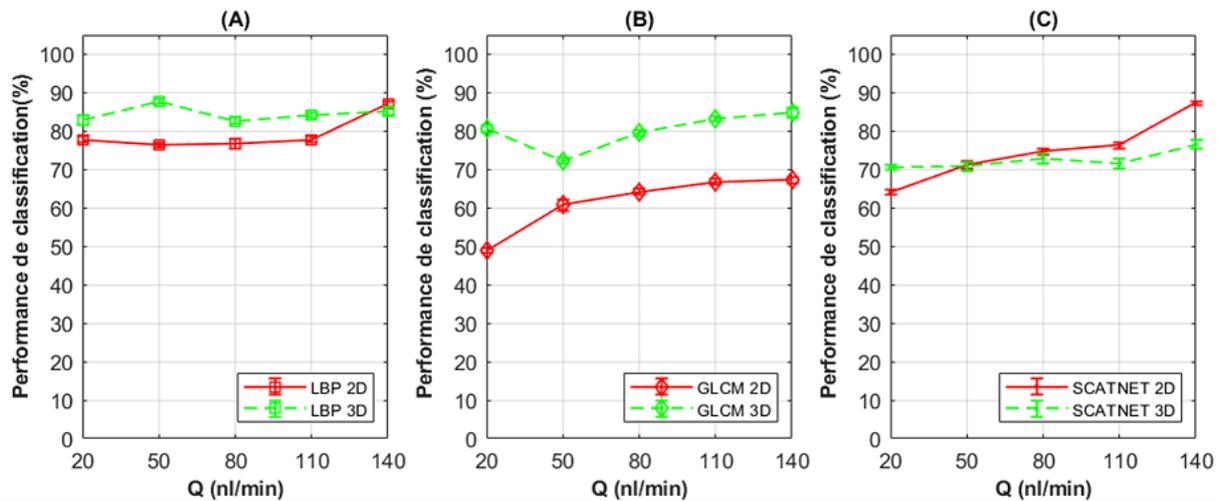


FIGURE 4.5 – Performances de classification (%) (précision) d'images simulées de cellules uniques de microscopie microfluidique à feuillet de lumière 2D et 3D basées sur les différences de densité des marqueurs fluorescents en fonction de la vitesse de cellule Q pour les méthodes texturales : (A) LBP, (B) GLCM et (C) transformée en scattering.

pour les données de vitesse standard ($SSIM_{50 \text{ nl/min}} = 0.85$, $SSIM_{140 \text{ nl/min}} = 0.81$). Ces résultats sur les données simulées montrent un effet réduit de la microfluidique sur le débruitage des images et la puissance de CARE à surmonter le niveau de bruit élevé lorsque la limite de vitesse des cellules (140 nl/min) est utilisée.

Pour étudier l'efficacité de CARE entraîné sur les données simulées pour le débruitage des images réelles, nous avons ensuite appliqué chaque modèle de débruitage aux images de l'ensemble des données réelles correspondantes.

4.5.2 Analyse d'images réelles

4.5.2.1 Classification d'images réelles avant débruitage

Les performances de classification des trois classes d'images de cellules réelles WT, XD et MD, basées sur les espaces de caractéristiques texturales en fonction de la vitesse des cellules sont présentées dans le tableau 4.2. Les résultats trouvés pour les images brutes (tableau 4.2.Brutes) sont conformes à ce qui étaient trouvés avec les images simulées (voir figure 4.5). Premièrement, les différences entre les performances de classification pour les vitesses de cellules standard et rapide sont très proches (globalement une différence de l'ordre de $\approx 1 - 3\%$) pour les trois méthodes texturales. Par conséquent, ces résultats montrent que les artefacts de la microfluidique ont un effet très réduit sur la performance de tri des cellules comme trouvée avec la simulation.

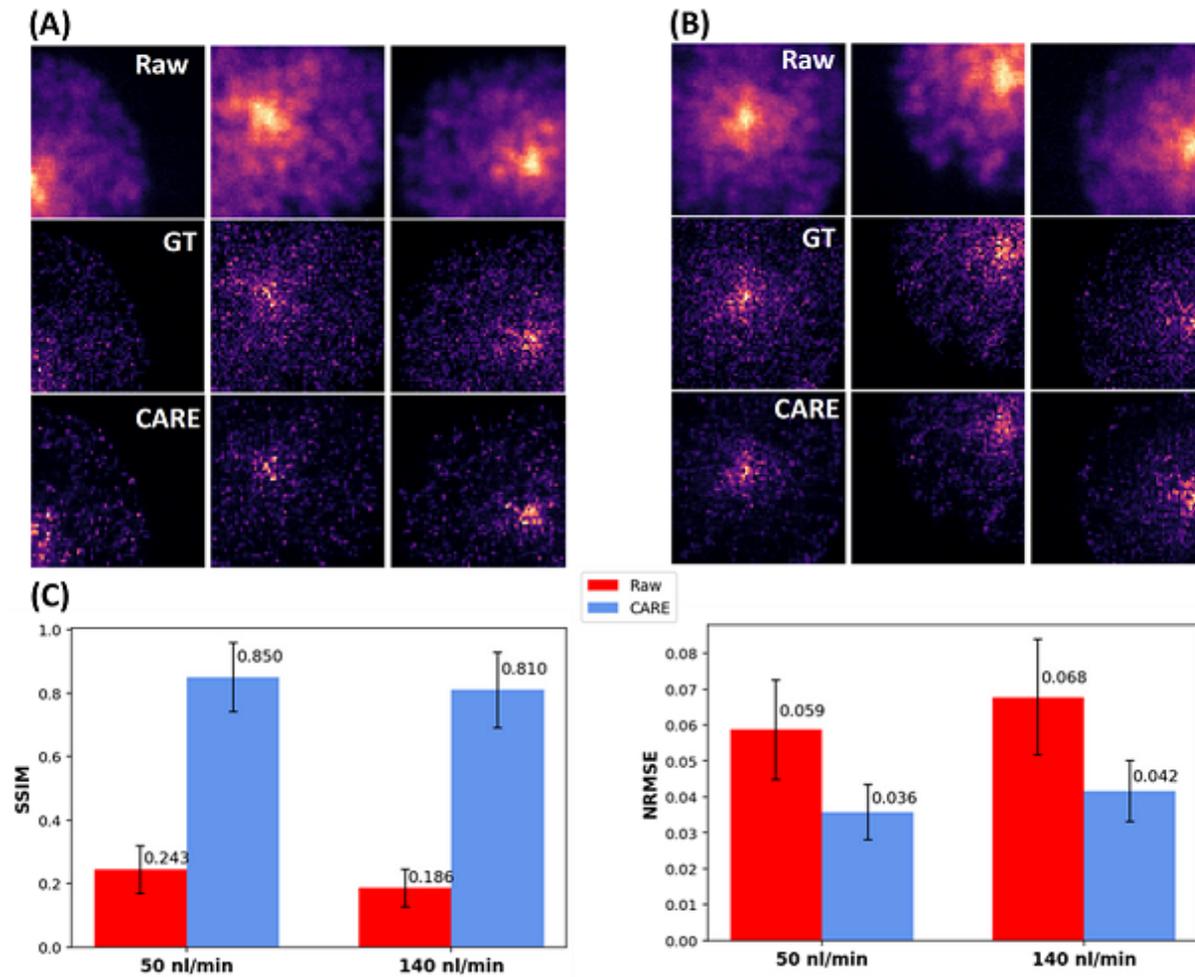


FIGURE 4.6 – Débruitage des images synthétiques par apprentissage profond (CARE). Illustration des patches bruts (Raw), vérités terrains (GT) et débruités avec CARE à partir d’un ensemble de données avec une vitesse de cellule de (A) 50 *nl/min* et (B) 140 *nl/min*. (C) Performance du débruitage évaluée par la moyenne de la SSIM (la plus élevée est la meilleure.) et de la NRMSE (la plus faible est la meilleure.) calculées pour 40 images de test pour chaque vitesse cellulaire. Les barres en rouge sont la métrique calculée entre les paires (Raw, GT) et les barres en bleu sont celles de (CARE, GT). Les lignes noires représentent les barres d’erreur.

Deuxièmement, concernant les méthodes texturales, le LBP et la transformée en scattering, en 2D et en 3D, montrent des performances de classification plus importantes que la méthode de GLCM. Alors qu’une meilleure performance est remarquée pour la méthode de la transformée en scattering en 3D lorsque les images sont acquises avec une vitesse standard. Cependant, cette performance est trouvée très proche, voir similaire à la performance de classification basée sur la même méthode texturale lorsque la vitesse des cellules est plus rapide (une différence de $\approx 0.8\%$). Ceci garantit une possibilité

d'utiliser cette méthode texturale pour la classification des cellules en configurant la plate-forme de microscopie microfluidique avec la plus haute vitesse possible sans avoir une perte significative de performance sur le tri des cellules.

Ensuite, un autre point important dans le tri de cellule à haut débit est la réduction du coup d'acquisition et de calcul. Ce point concerne bien les dimensions des images 2D et 3D, où les volumes des images 3D sont plus coûteuses en terme d'acquisition, en mémoire de stockage et en temps d'analyse, que les images 2D. Pour cela, nous avons analysé la différence des performances de classification entre les images 2D et 3D. Bien que l'efficacité de tri soit plus élevée en 3D, les résultats ont montré une différence de performance de classification très limitée entre les images 2D et 3D. De plus, nous avons comparé le temps d'extraction des caractéristiques et le temps de classification des images en 2D et en 3D. Ces temps de calcul sont illustrés dans le tableau 4.3 et ils ont été obtenus avec un processeur Intel Core i7-6700HQ CPU @ 2.60 GHz. Tenant compte des temps de calcul d'un côté, et la différence entre les performances de classification des images 2D et 3D à une vitesse rapide d'un autre côté, nous avons trouvé que la transformée en scattering en 2D permet d'avoir un meilleur compromis entre temps de calcul et performance de classification. En effet, la différence de performance entre 2D/3D est de l'ordre de $\approx 3\%$ et la différence en temps de calcul pour les images 2D est de $\approx 60\%$ moins que pour les 3D.

En résumé, cette comparaison nous permet de considérer que le tri des cellules basé sur la transformée en scattering en 2D avec une vitesse de cellules rapide de 140 nl/min pourra être une solution optimale pour accélérer jusqu'au bout le tri des cellules en microscopie microfluidique avec une perte très négligeable.

4.5.2.2 Classification d'images après débruitage

Dans l'objectif d'étudier la possibilité d'amélioration de la performance de classification des images réelles après la réduction des effets de la microfluidiques, nous avons appliqué les algorithmes de débruitage CARE et Noise2void, basés sur l'apprentissage profond, sur les bases des données réelles. La méthode CARE a été entraînée avec les images simulées et appliquées sur les images réelles tandis que Noise2void a été entraîné directement sur les images réelles. Les performances de débruitage de ces deux algorithmes ont été étudiées en utilisant le rapport signal/bruit (SNR) calculé comme le rapport de la moyenne des intensités des signaux des cellules sur l'écart-type des signaux du bruit de fond. Des illustrations des images réelles brutes et après débruitages avec CARE et Noise2void sont présentées dans la figure 4.7-A et -B. Les valeurs moyennes de SNR calculées à partir de 60 images réelles avant et après débruitage

TABLEAU 4.2 – Performances de classification de données réelles (% de précision) pour des images brutes, et après débruitage CARE et Noise2void, basées sur des espaces de caractéristiques texturales et pour des vitesses de cellule standard et rapide. Les cellules du tableau en gris représentent les valeurs de classification les plus élevées en 2D et 3D pour chaque expérience réalisée.

Images	Caractéristiques	Vitesses des cellules			
		Standard		Rapide	
		2D	3D	2D	3D
Brutes	LBP	90.5 ± 1 %	95.4 ± 0.7 %	89.8 ± 1.2 %	89.6 ± 1.5 %
	GLCM	79.2 ± 1.8 %	85.3 ± 1.4 %	86.3 ± 0.8 %	87.2 ± 1.5 %
	SCATNET	91.6 ± 0.9 %	96 ± 0.9 %	92.5 ± 1.3 %	95.2 ± 1.2 %
CARE	LBP	91.6 ± 2 %	93.1 ± 0.9 %	90.1 ± 2.3 %	91.7 ± 2 %
	GLCM	79.9 ± 2.2 %	86.2 ± 2.1 %	77.8 ± 3.4 %	78.3 ± 2.2 %
	SCATNET	94.1 ± 1.5 %	97.1 ± 1.7 %	93.6 ± 1.6 %	96.1 ± 0.9 %
Noise2void	LBP	89.3 ± 1.98 %	98.3 ± 0.9 %	95.2 ± 1.5 %	81.1 ± 2.7 %
	GLCM	77.1 ± 2.3 %	84.3 ± 2.7 %	95.1 ± 0.7 %	95 ± 1.1 %
	SCATNET	91 ± 2.2 %	95.8 ± 1.4 %	95.5 ± 1.1 %	95.2 ± 0.9 %

TABLEAU 4.3 – Temps de calcul pour l'extraction de l'espace des caractéristiques, l'entraînement et la classification des images réelles 2D/3D, à vitesse standard/rapide.

Paramètres (Temps (T.) en seconde)	Caractéristiques					
	2D			3D		
	LBP	GLCM	SCATNET	LBP	GLCM	SCATNET
Nb de caractéristiques / image	243	14	417	1000	182	1251
T. d'extraction / image	0.34	0.06	0.9	3.2	8.6	1.6
T. d'entraînement / ≈ 4000 images	0.9	95	3.2	11	13	3.5
T. de classification / image	4.6×10^{-5}	2.3×10^{-5}	6.9×10^{-5}	2×10^{-3}	5.7×10^{-5}	2.3×10^{-4}

CARE et Noise2void pour chaque ensemble de données de vitesse des cellules sont aussi présentées dans la figure 4.7-C.

Les résultats montrent un niveau de bruit plus élevé pour les images acquises à une vitesse rapide de 140 *nl/min* exprimé par une baisse du niveau de SNR ($SNR_{50 \text{ nl/min}} = 4.3$, $SNR_{140 \text{ nl/min}} = 3.5$). Cette baisse représente une augmentation des artefacts lorsque la vitesse de passage des cellules dans le microcanal augmente. De plus, le Noise2void révèle une efficacité de débruitage qui surmonte celle de CARE pour les deux vitesses de cellules standard et rapide. Cela pourrait être dû au fait que CARE a été entraîné sur les données simulées comme un réseau pour déconvoluer les images, similaire aux algorithmes de déconvolution classiques, tandis que la Noise2void a été utilisé comme

un réseau de débruitage.

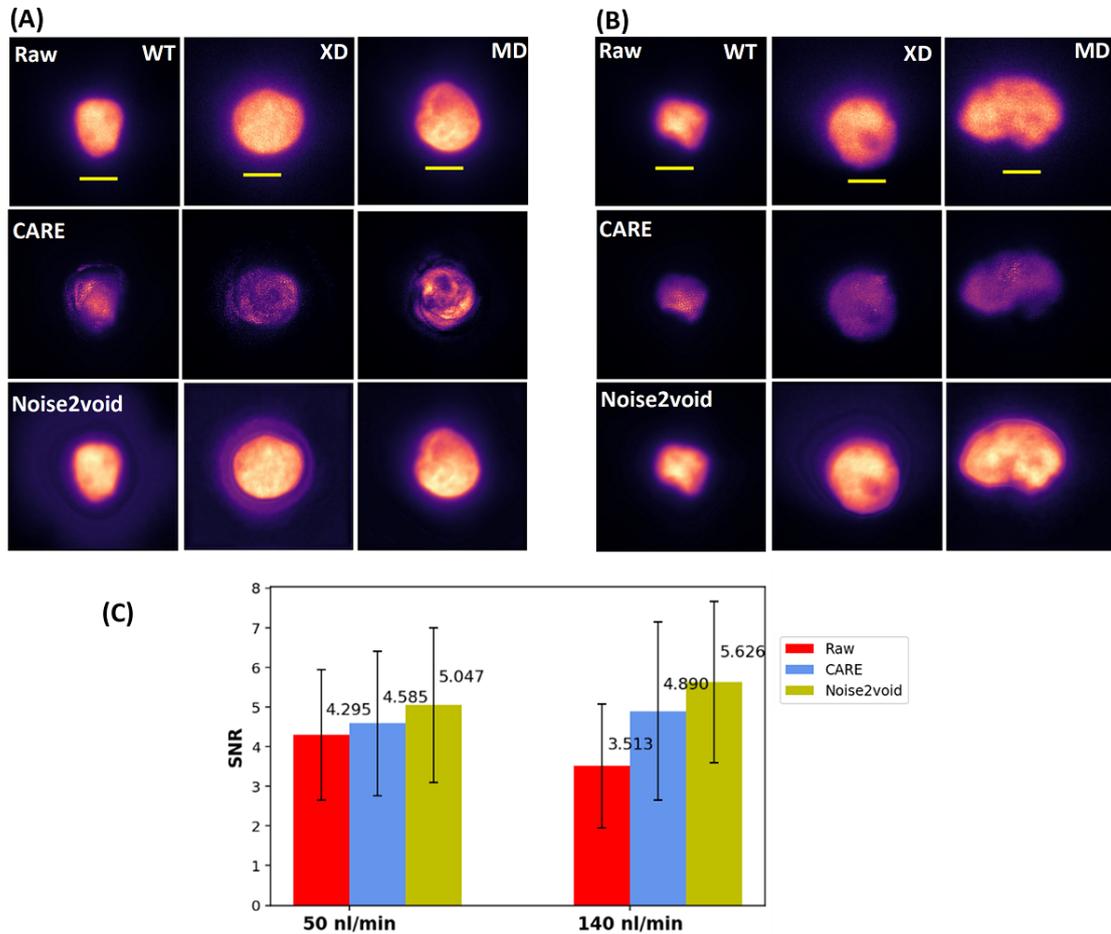


FIGURE 4.7 – Débruitage d’images microscopiques réelles. Illustration des plans XY calculés par une projection maximale sur z d’images brutes, et après débruitage par CARE et Noise2void d’un ensemble de données avec une vitesse de cellules : (A) 50 nl/min et (B) 140 nl/min . (C) Rapport signal/bruit (SNR) calculé à partir de 60 images réelles avant et après débruitage CARE et Noise2void pour chaque ensemble de données de vitesse de cellules. Barre d’échelle en jaune = 5 μm .

De plus, en ce qui concerne la performance de classification après débruitage des images avec CARE et Noise2void, ces résultats sont présentés dans le tableau 4.2.CARE et tableau 4.2.Noise2void respectivement. Par comparaison avec les résultats des images brutes, CARE permet globalement d’améliorer légèrement la performance de classification pour toutes les méthodes texturales pour les deux vitesses de cellules. Par exemple, la performance de classification basée sur la transformée en scattering est améliorée de 91.6% à 94.1% et de 96% à 97% pour les images 2D et 3D respectivement pour une vitesse standard, et de 92.5% à 93.6% et de 95.2% à 96.1% pour les images 2D et 3D respectivement pour une vitesse rapide. Tandis que, le Noise2void permet

d'améliorer la performance seulement pour des cas spécifiques en 2D ou en 3D, comme par exemple, pour le LBP 3D avec une vitesse de cellule standard, de 96% à 98.3%, et encore de diminuer l'écart entre le 2D et le 3D pour le scattering transform pour une vitesse de cellules rapide (de 3% à 0.3%).

Finalement, ces résultats de classification après le débruitage, permettent d'un côté, d'ouvrir les voies vers plus de choix d'optimisation en améliorant la performance de tri et en réduisant la perte de performance de l'utilisation de la vitesse de cellule rapide au lieu de standard et des images 2D au lieu de 3D. Et d'un autre côté, les résultats obtenus permettent de montrer la configuration numérique donnant la performance de classification maximale (cas LBP 3D après débruitage Noise2void).

4.5.2.3 Analyse d'images mal-classées

Une étape importante lors d'une telle étude appliquée à la classification des cellules est d'analyser les images de cellules mal-classées. La figure 4.8-A -B et -C montre respectivement des exemples d'images de cellules de type WT, XD et MD mal-classées obtenues durant les expériences illustrées dans le tableau 4.2. La plupart des images mal classées sont trouvées des images contenant des "fausses cellules" telles que des particules de poussière, des cellules en mitose, des régions d'intérêt mal alignées, des régions d'intérêt contenant plusieurs cellules, etc. Ces fausses cellules affectent les performances de classification et présentent des défis en microfluidique et en cytométrie. Plusieurs solutions pourront être envisagées pour résoudre ce problème. Premièrement, une étape de pré-traitement des images, telle que la régularisation des images en direction de z pour aligner les tranches des images, ou la segmentation basée sur l'apprentissage automatique pour sélectionner une seule région d'intérêt. Par contre, cette solution permet de ne résoudre qu'une partie du problème. Une autre solution plus simple est d'ajouter une quatrième classe pour les images des fausses cellules. Cette solution permet de résoudre les différentes sources des fausses cellules, mais elle pourrait conduire à exclure un nombre important des cellules imagées de l'étude.

4.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de la microfluidique sur la classification des images de cellules en utilisant à la fois des cellules synthétiques et des images réelles de cellules épithéliales mammaires humaines. Cette étude est importante en cytométrie pour identifier la vitesse limite de passage des cellules dans le microcanal permettant de garantir un tri à haut débit avec une haute performance. Nous avons simulé deux classes d'images de cellules uniques (saines et cancéreuses) avec des marqueurs fluorescents

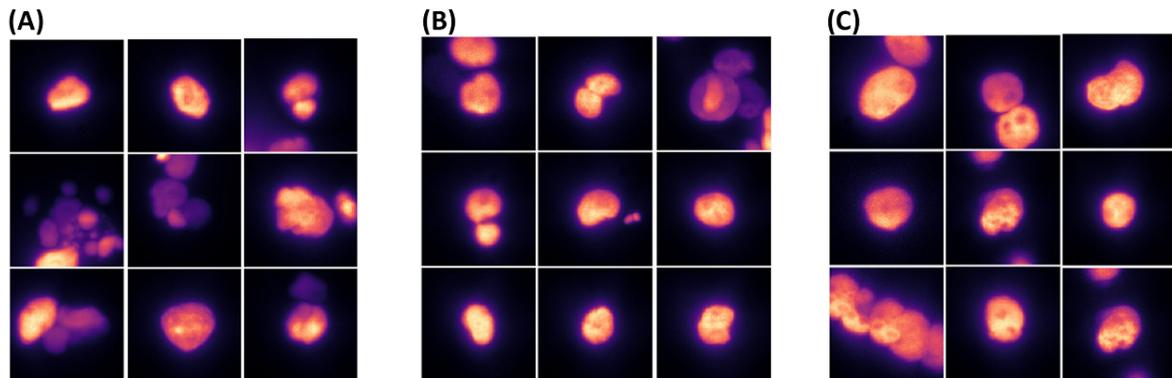


FIGURE 4.8 – Illustration des plans XY des images mal classées pour les types de cellules (A) WT, (B) XD et (C) MD, collectées à partir de diverses expériences de classification du tableau 4.2.

présentant une faible différence de densité. Nous avons ensuite utilisé les données simulées pour étudier la performance de classification en fonction des vitesses des cellules ainsi que le débruitage via des algorithmes de débruitage profond (CARE). Nous avons constaté, en se basant sur les données simulées, que la vitesse des cellules a un effet réduit sur la performance de classification et cette performance est presque stable pour toutes les vitesses testées allant de 20 à 140 nl/min . De plus, nous avons comparé la performance de classification entre les images 2D et 3D. Les résultats ont montré un écart très limité entre les images 2D et 3D pour des espaces de caractéristiques spécifiques tels que le LBP et la transformée en scattering. Conformément aux résultats obtenus sur les données synthétiques, les résultats sur données réelles ont montré que les performances de classification obtenues en utilisant une vitesse de cellule rapide (140 nl/min) sont très proches de celles d'une vitesse standard (50 nl/min), et que les images 2D peuvent être utilisées pour le tri avec une perte de performance très limitée.

Nous avons ensuite appliqué les algorithmes de débruitage CARE et Noise2void où CARE est entraîné sur les données simulées et Noise2void sur les images réelles. La performance de débruitage est évaluée en utilisant le rapport signal/bruit (SNR) et la performance de classification. Les résultats après le débruitage des images ont montré l'efficacité de ces méthodes de débruitage pour améliorer la qualité des images acquises dans le microcanal et la capacité à améliorer la performance de classification.

Cette étude a permis de répondre à des questions importantes en cytométrie, en proposant des solutions pour les aspects physiques de la microfluidique, comme la vitesse de cellules et les aspects numériques des méthodes de tri, comme les espaces de caractéristique texturales optimaux, le débruitage des images et enfin les dimensions

des images. De plus, elle a mis en relief l'importance de la simulation pour l'instrumentation virtuelle et pour l'augmentation des données.

Dans cette présente étude, nous avons considéré des méthodes texturales classiques pour la classification. Avec ces méthodes, nous avons pu atteindre une très bonne performance de tri de l'ordre de 98.3% avec le LBP 3D. D'autres algorithmes basés sur l'apprentissage profond, comme le CNN, peuvent être testés dans l'objectif d'amélioration de la performance de tri. De plus, la technique de microscopie de fluorescence à feuillet de lumière a été utilisée dans cette étude pour l'imagerie des cellules à haut débit. D'autres types de microscopies, comme la microscopie à illumination structurée à feuillet de lumière [210, 211] pourrait être testée pour garantir à la fois une imagerie à haut débit et une reconstruction super-résolue des images 3D acquises.

La microfluidique et la microscopie ont été utilisés dans cette étude pour l'imagerie des cellules à l'échelle de la cellule unique. Ces systèmes n'ont encore jamais été couplés ensemble pour l'imagerie à haut débit et la culture d'autres structures cellulaires, comme les sphéroïdes [9, 23, 212]. Cependant, l'importance de l'imagerie à haute qualité et haut débit de ces structures se base non seulement sur la plateforme d'acquisition, mais aussi sur l'étape de préparation de ce type d'échantillons, notamment la clarification des sphéroïdes. Nous nous focalisons sur cette étape de clarification avec une perspective d'analyse d'images dans le chapitre suivant.

Vers une clarification numérique en imagerie des sphéroïdes

Sommaire du présent chapitre

5.1	Introduction	97
5.2	Préparation et acquisition d'images des échantillons de sphéroïdes	98
5.2.1	Formation de sphéroïdes dans des microsystemes à base d'agarose	98
5.2.2	Marquage de cellules dans les sphéroïdes	100
5.2.3	Clarification des échantillons	100
5.2.4	Acquisition d'images de sphéroïdes	101
5.3	Annotation des données	101
5.4	Normalisation des sphéroïdes en profondeur z	102
5.5	Évaluation de la qualité des images sur la base de métriques locales	102
5.6	Méthodes de segmentation par apprentissage profond	103
5.6.1	Unet	104
5.6.2	Post-traitement basé sur la Morphologie Dynamique (DM)	104
5.6.3	Dist	105
5.6.4	Stardist	106
5.7	Fonctions de perte d'apprentissage et métriques d'évaluation de la segmentation	107
5.7.1	Fonctions de perte	107
5.7.2	Métriques d'évaluation de la performance de segmentation	108

5.8	Optimisation des hyper-paramètres	108
5.9	Apprentissage par transfert	110
5.10	Résultats et discussion	110
5.10.1	Comparaison des méthodes de clarification avec les métriques locales	110
5.10.2	Segmentation des images 2D des sphéroïdes	111
5.10.3	Transférabilité des modèles de segmentation à d'autres ensembles de données	113
5.10.4	Faisabilité de la clarification numérique des sphéroïdes	116
5.11	Conclusion	119

5.1 Introduction

L'apprentissage profond révolutionne actuellement l'imagerie computationnelle [115]. En effet, il permet de lever des contraintes sur la reconstruction des images brutes qui peuvent être directement traitées par les réseaux de neurones sans avoir à passer par la production d'une belle image interprétable par un cerveau humain. Cette révolution touche également une autre étape en imagerie avec la préparation des échantillons via des agents de contraste ou de clarification. En microscopie, notamment, ces agents de contrastes sont des produits chimiques très souvent utilisés pour magnifier le contraste ou débruiter l'échantillon en vue de permettre à un humain de pouvoir interpréter les détails d'intérêt. Ce marquage de l'échantillon avec un agent de contraste est coûteux en temps et possiblement invasif (nécessitant de fonctionner *ex-vivo* ou encore déformant les tissus). L'usage des réseaux de neurones pour court-circuiter cette étape de marquage a notamment été montré en histopathologie 2D *ex-vivo* [213]. Dans ce même esprit, visant à réduire le temps de préparation de l'échantillon, nous montrons une nouvelle utilisation des réseaux de neurones pour de l'imagerie de culture *in vitro* en 3D.

Dans les sciences de la vie, on s'intéresse de plus en plus aux modèles de culture en 3D pour mieux reproduire l'environnement 3D rencontré *in vivo*. L'imagerie de ces modèles de culture 3D est essentielle pour la découverte de médicaments, mais elle doit faire face à plusieurs problèmes avant que son utilisation ne se généralise. L'examen microscopique approfondi de ces modèles cellulaires 3D se heurte au défi de la pénétration de la lumière en profondeur dans les tissus biologiques opaques. Pour surmonter cette limite, diverses techniques de clarification ont vu le jour au cours des dernières décennies [82]. Cependant, il n'est pas aisé de choisir les meilleurs protocoles de clarification et d'évaluer quantitativement leur efficacité. En nous concentrant sur les sphéroïdes, nous proposons un benchmark selon une méthode générique avec des mesures de contraste local et une segmentation des noyaux basée sur un réseau neuronal convolutif profond (*Convolutional Neural network (CNN)*). Nous allons plus loin en testant la possibilité de transférer les connaissances de segmentation d'un protocole de clarification à un autre. En particulier, un transfert intéressant est celui de modèle de réseau de neurones entraînés sur des modèles clarifiés et appliqués à des images non clarifiées. Ces résultats ouvrent la voie vers une clarification numérique qui permettrait d'accélérer la préparation des échantillons et de se passer de la clarification.

Un schéma du pipeline opérationnel de l'étude est fourni dans la figure 5.1. Nous comparons les protocoles de clarification RapiClear et Glycérol (figure 5.1-A) à des échantillons non clarifiés (Contrôle). Les deux méthodes de clarification étudiées ont été

choisies pour leur simplicité et leur non-toxicité. RapiClear [214] et Glycérol [85] ont déjà été connues comme des procédures de clarification rapides et rentables mais efficaces, pour des échantillons de taille moyenne tels que des organoïdes et des sphéroïdes de quelques centaines de micromètres. Tout d’abord, nous évaluons la qualité de la clarification des images de sphéroïdes acquises par microscopie confocale à fluorescence avec les métriques locales conventionnelles telles que le rapport signal/bruit (SNR) et le rapport contraste/bruit (CNR) (figure 5.1-B). Ensuite, nous utilisons des méthodes de segmentation par apprentissage profond pour évaluer la qualité de la clarification (figure 5.1-C et -D). Enfin, nous étudions la possibilité de clarifier numériquement des données non clarifiées par des modèles de données clarifiées via l’apprentissage par transfert et la transférabilité des connaissances d’un protocole de clarification à un autre, comme par exemple, Le TDE, ScaleS et CUBIC (figure 5.1). Dans ce chapitre, nous montrons qu’en utilisant une stratégie simple d’apprentissage profond, il est possible d’obtenir des images segmentées fiables même pour des images de faible intensité et de faible rapport signal/bruit. Nous démontrons également la transférabilité de la connaissance de la segmentation des échantillons clarifiés aux tissus natifs pour une clarification numérique rapide des spécimens vivants à la volée. Dans ce qui suit, nous présentons les détails de toutes les étapes décrites dans le résumé graphique de la figure 5.1.

5.2 Préparation et acquisition d’images des échantillons de sphéroïdes

5.2.1 Formation de sphéroïdes dans des microsystemes à base d’agarose

5.2.1.1 Conception de microsystemes et fabrication de moules

Des microsystemes à base d’agarose ont été utilisés pour la formation de sphéroïdes. Ces microsystemes permettent la formation de centaines de sphéroïdes reproductibles en un seul pipetage. En bref, un moule principal est créé en utilisant la technique classique de photolithographie. Le moule est constitué de 130 micropuits cylindriques de $200\ \mu\text{m}$ de diamètre et $250\ \mu\text{m}$ de hauteur. Une réplique du moule en polydiméthylsiloxane (PDMS) a ensuite été coulée sur ce moule principal. Les microsystemes finaux à base d’agarose ont ensuite été produits en moulant l’agarose dans ce moule en PDMS. Vous trouverez plus de détails sur le processus dans [215] (Patent FR3079524A1, 2018).

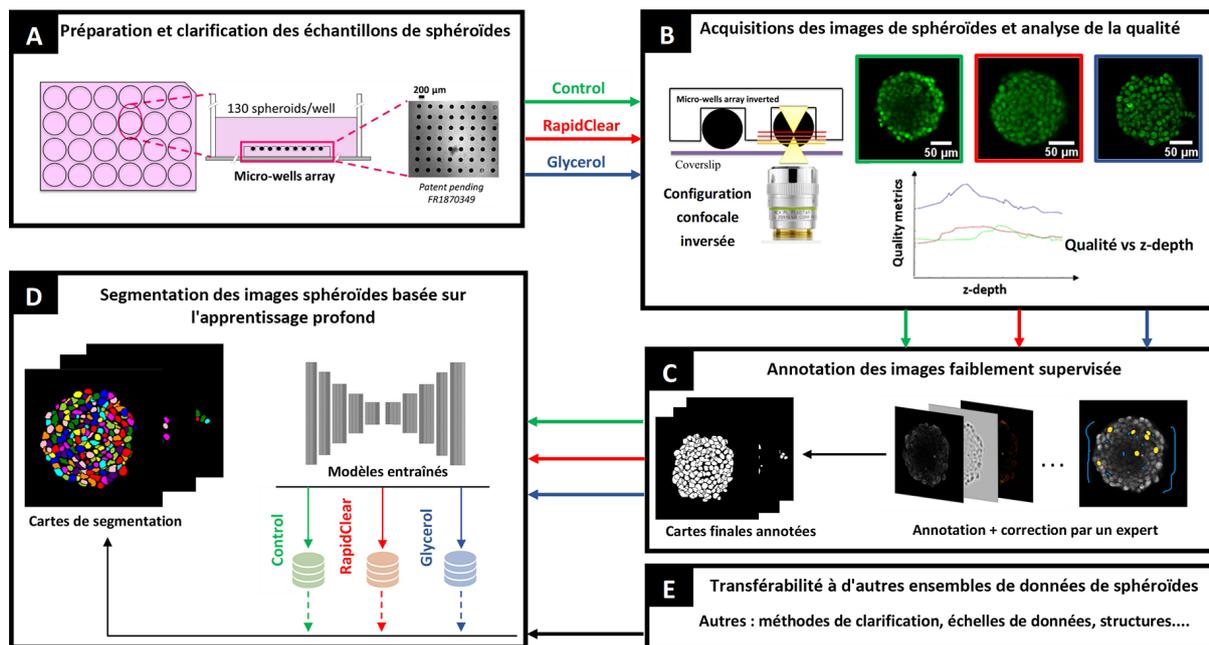


FIGURE 5.1 – Schéma global de l'étude. (A) Les échantillons de sphéroïdes sont cultivés dans des réseaux de micro-puits. Le contrôle sont les échantillons non clarifiés et les autres sont clarifiés avec deux méthodes de clarification distinctes : Rapiclear et Glycérol. (B) Ensuite, les images de sphéroïdes acquises avec un microscope confocale sont analysées pour évaluer la qualité le long de la profondeur z. (C) Un ensemble de données d'images pour chaque méthode de clarification est annoté à l'aide d'un algorithme des forêts d'arbres décisionnels et corrigé par un expert. (D) Enfin, les modèles d'apprentissage profond sont entraînés avec les ensembles de données annotées et les trois modèles de segmentation entraînés sur les données de Rapiclear, Contrôle et Glycérol sont testés pour (E) la transférabilité des données sur diverses méthodes de clarification.

5.2.1.2 Microsystèmes à base d'agarose

La solution d'agarose (2%, p/v) a été préparée en dissolvant de la poudre d'agarose ultra-pure (Invitrogen) dans l'eau. Un autoclave a été utilisé pour la dissolution à une température 121°C pendant 15 minutes afin d'éviter la formation de bulles. La solution d'agarose (300 µL) a été déposée sur un moule PDMS chauffé à 78°C et une lamelle couvre-objet a ensuite été placée sur la goutte d'agarose pour l'étaler avec une épaisseur constante sur le moule. Après la gélification de l'agarose dans la forme souhaitée, le couvre-objet a été retiré et les micropuits d'agarose moulés ont été découpés pour s'adapter aux puits d'une plaque de 24 multipuits. Les micropuits ont ensuite été placés dans une plaque et maintenus hydratés avec du PBS (1 mL/puits). La plaque a été stérilisée aux UV (8 W, 254 nm) pendant 20 min à l'état ouvert et fermé et conservée à 4°C jusqu'à son utilisation. La veille de chaque expérience, le PBS a été remplacé par le milieu de culture et laissé diffuser dans chaque micropuits par une incubation d'une

nuit à 37°C avant l'ensemencement des cellules.

5.2.1.3 Implantation des cellules et formation des sphéroïdes

La lignée cellulaire de carcinome colorectal HCT-116 a été utilisée dans cette étude. Les sphéroïdes HCT-116 ont été formés dans des plaques à 24 puits contenant des micropuits d'agarose. Les cellules ont étéensemencées dans chaque plaque de 24 puits contenant des microsystemes à une densité de 1.2×10^5 cellules/mL, 1 mL par puits. Cela conduit à un ensemencement initial de 20-30 cellules/micro-puits. Afin d'encourager et d'accélérer l'agrégation des cellules, la plaque de 24 puits a été placée sous agitation orbitale (160 rpm) pendant 15 min dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Après 4 heures, la plaque a été rincée avec du milieu frais pour éliminer les cellules qui n'ont pas atteint les micropuits. Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MCT) sont formés en 1 jour et sont utilisés au jour 5 dans cette étude. Le marquage, la clarification et l'imagerie fluorescente sont réalisés in-situ dans le microsysteme à base d'agarose, sans manipulation des sphéroïdes.

5.2.2 Marquage de cellules dans les sphéroïdes

Au jour 5, les sphéroïdes ont été lavés 3 fois avec du PBS chauffé pendant 5 minutes, puis fixés au paraformaldéhyde (3.7% dans du PBS) pendant 20 minutes. Tous les puits ont ensuite été lavés avec du PBS/3% BSA (3×5 min), perméabilisés avec du Triton 0.5% pendant 20 min, et rincés à nouveau avec du PBS/ 3% BSA (3×5 min). Pour colorer les noyaux de cellules, le réactif NucGreen Dead 488 ReadyProbes a été utilisé (Invitrogen R37109, 2 gouttes/mL, soit 2 gouttes par puits, 4 heures à température ambiante). Les échantillons ont été lavés avec du PBS (1×10 min) et conservés à l'abri de la lumière dans du PBS à 4°C jusqu'à l'acquisition des images. Ces échantillons non nettoyés ont été soit imagés directement (condition Contrôle), soit traités avec différentes méthodes de nettoyage, décrites ci-dessous.

5.2.3 Clarification des échantillons

Différentes techniques de clarification ont été utilisées. Les micropuits ont été incubés pendant la nuit soit avec la solution RapiClear 1.52 (sunjinlab), soit avec une solution de Glycérol (80% de glycérol dans du PBS (v/v)). Les microsystemes ont ensuite été montés avec 35 μ L de solution fraîche clarifiée entre 2 lamelles couvre-objet, séparées par un espaceur collant de 1 mm (Ispacer de 2 × 0,5 mm d'épaisseur, SunJin Lab).

Le composé chimique 2.2'-thiodiéthanol (TDE) a également été testé dans cette étude, selon la procédure décrite dans [216]. En bref, les micropuits ont d'abord été incubés dans une solution de TDE à 20% dans du PBS (v/v) pendant 1 heure, puis transférés dans une solution de TDE à 47% dans du PBS (v/v) pendant 2 heures. Les microsystèmes ont ensuite été montés dans une solution fraîche de TDE/PBS à 35 μL à 47% entre 2 lamelles couvre-objet, séparées par un intercalaire collant de 1 mm (Ispacer de $2 \times 0,5 \text{ mm}$ d'épaisseur, SunJin Lab).

Pour les méthodes de clarification ScaleS et CUBIC, nous avons utilisé les données existantes de la littérature décrite dans [93, 217].

5.2.4 Acquisition d'images de sphéroïdes

Des piles d'images (z-stacks) de 1024×1024 pixels en xy ont été acquises à l'aide d'un montage confocal classique. Les images RapiClear ont été acquises avec le Leica SP5 en mode résonant, un objectif sec de 20x (NA=0,7) est utilisé avec une échelle de pixels de 0.2 μm en xy et un pas de 1 μm dans la direction z . Les images de contrôle, de glycérol et de TDE sont acquises avec le Nikon A1Rplus en utilisant un objectif à immersion d'eau de 20x (NA=0,7) avec une échelle de pixels de 0.243 μm en xy et un pas en z de 2 μm . Un laser à argon de 488nm a été utilisé pour détecter le marqueur NucGreen. À noter que toutes les images 2D de sphéroïdes ont été normalisées pour avoir une moyenne nulle et une variance égale à 1 afin de compenser la variation d'intensité avant le processus d'apprentissage automatique des modèles.

5.3 Annotation des données

L'annotation de la vérité terrain a été effectuée d'une manière semi-automatique à l'aide de l'outil interactive d'apprentissage et de segmentation (Ilastik, pour *Interactive Learning and Segmentation Toolkit*) [218] basée sur les forêts d'arbres décisionnels (Random Forest) suivi d'une correction par un expert (figure 5.1-C). Des images 2D du début, du milieu et de la fin des piles d'images 3D appartenant à chaque condition de clarification ont été sélectionnées pour une représentation exhaustive des instances et des effets de clarification sur les profondeurs des images. Le mode de classification par pixel a ensuite été utilisé pour générer des cartes de segmentation primaire. Les filtres utilisés dans l'étape de segmentation étaient des filtres d'intensité, de bord et de texture avec des tailles de noyau variées allant de 0.7 à 10 pixels afin de représenter les détails les plus fines et les plus grands de la transition entre les noyaux et le fond (36 filtres). Ensuite, nous avons appliqué le traitement par lots pour segmenter toutes les images

de l'ensemble des données 2D. Enfin, une étape de correction manuelle produite par un expert a été appliquée aux cartes de segmentation. La quantité totale d'images 2D annotées était de 57 pour chaque condition de clarification. Les ensembles de données ont ensuite été divisés en 47 pour l'entraînement, 5 pour la validation et 5 pour le test des modèles d'apprentissage profond. Le nombre total de noyaux cellulaires était d'environ 10000 pour chaque ensemble de données d'une condition de clarification.

5.4 Normalisation des sphéroïdes en profondeur z

Les images de sphéroïdes 3D de différentes épaisseurs ont été normalisées en profondeur z en considérant la tranche ayant le plus grand diamètre comme le centre du sphéroïde. Le diamètre de chaque tranche de sphéroïde a été calculé à partir de la projection d'intensité maximale binarisée du volume 3D sur l'axe des ordonnées y. Le pourcentage du diamètre a ensuite été calculé pour chaque tranche en fonction de la valeur maximale du diamètre. Sur la base de cette méthode de normalisation, et pour une comparaison équitable entre les protocoles, nous avons considéré des tranches de profondeur allant de 70 à 100 % du diamètre maximum (voir figure 5.5).

5.5 Évaluation de la qualité des images sur la base de métriques locales

Nous évaluons d'abord localement la qualité des images de sphéroïdes en fonction de la profondeur z en utilisant des métriques statistiques sont le rapport signal/bruit (SNR) et le rapport contraste/bruit (CNR) calculé de deux manières : le coefficient de Bhattacharyya (BC) et le rapport de Fisher (FR). Ces métriques sont définies comme suit,

$$SNR = \frac{\mu_{signal}}{\sigma_{noise}}, \quad (5.1)$$

$$CNR_{BC} = 1 - \sum_{X=1}^{255} \sqrt{p_d(X) \cdot q_d(X)}, \quad (5.2)$$

$$CNR_{FR} = \frac{(\mu_{signal} - \mu_{noise})^2}{V_{signal} + V_{noise}}, \quad (5.3)$$

où, μ_{signal} , $p_d(X)$ et V_{signal} sont respectivement l'intensité moyenne du signal, la probabilité d'une valeur d'intensité du signal X et la variance du signal. De même, μ_{noise} , $q_d(X)$, V_{noise} , et σ_{noise} sont respectivement l'intensité moyenne du bruit, la probabilité d'une valeur d'intensité du bruit X, la variance et l'écart-type du bruit (voir figure 5.2). Nous

avons également calculé l'intensité moyenne normalisée (moyenne I/I_{max}) dans chaque tranche d'image pour illustrer le changement d'intensité le long des profondeurs. Tous ces facteurs ont été calculés pour trois sphéroïdes de chaque condition de clarification.

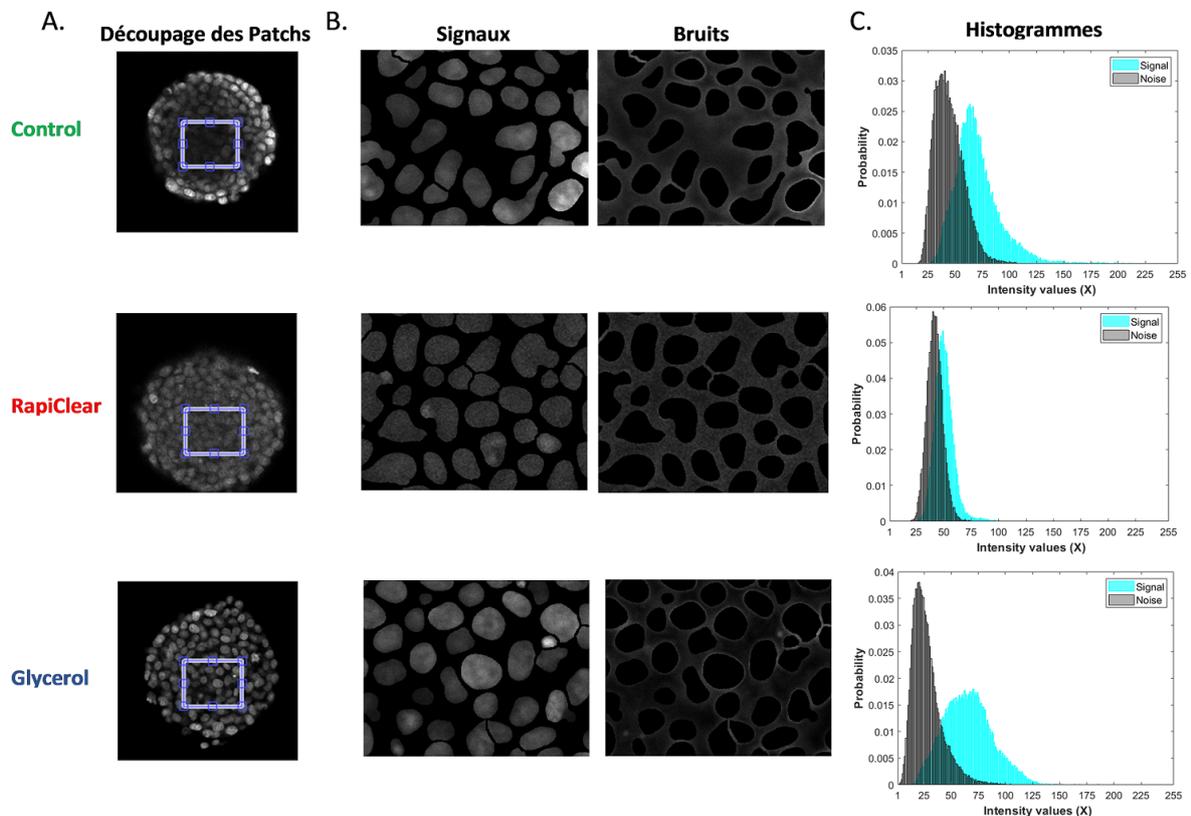


FIGURE 5.2 – Définition des patches pour le calcul des métriques locales. (A) Les patches sont découpés à partir du centre du sphéroïde dans chaque tranche le long de la profondeur z pour les jeux de données Contrôle, RapiClear et Glycérol. (B) Chaque patch est divisé en noyaux pris comme signal et en bruit comme fond extra-cellulaire. Ils sont utilisés pour calculer le rapport signal/bruit (SNR) et le rapport contraste/bruit par Fisher (CNR_{FR}). (C) Les histogrammes illustrent les valeurs de probabilité de l'intensité (X), où $X \in [1 \ 255]$ du signal des noyaux et du bruit. Ces distributions sont utilisées pour calculer le rapport contraste/bruit par le coefficient de Battacharayya (CNR_{BC}).

5.6 Méthodes de segmentation par apprentissage profond

Pour évaluer la qualité de la clarification, nous avons testé un ensemble de méthodes de segmentation de l'état de l'art basées sur l'apprentissage profond qui ont été utilisées pour la segmentation d'images de sphéroïdes en 2D (figure 5.1-D). Elles sont brièvement présentées dans cette section.

5.6.1 Unet

Nous avons utilisé le réseau de segmentation de référence Unet [208] pour prédire 2 classes de sortie (noyaux cellulaires et fond). Nous avons simplifié l'architecture en réduisant le nombre de canaux de caractéristiques. Nous utilisons des blocs de 5 pour les chemins de contraction et d'expansion, chacun composé de 2 couches convolutives avec 4.2^n ($n = 2, 3, 4, 5, 6$) filtres de taille 3×3 et fonction d'activation ReLU. Pour la carte de probabilité de sortie (\hat{y}), nous utilisons une couche convolutionnelle à un seul canal avec une fonction d'activation sigmoïde (voir figure 5.3-A). Le nombre total de paramètres entraînaibles était de 2158417 optimisées en utilisant l'optimiseur d'Adam [219] et les hyper-paramètres d'entraînement sont : $batch\ size = 1$, $epochs = 33$ et le taux d'apprentissage ($learning\ rate$) $lr = 1e^{-3}$. La carte de segmentation finale a été calculée par seuillage de la carte de probabilité par une valeur de seuil α qui a été optimisée sur l'ensemble des données de validation pour chaque condition. Le processus d'optimisation est décrit plus loin dans la même section.

5.6.2 Post-traitement basé sur la Morphologie Dynamique (DM)

La même architecture Unet décrite précédemment a été appliquée pour prédire la carte de probabilité (\hat{y}) suivie d'une étape de post-traitement basée sur la morphologie dynamique [220] et l'algorithme de Watershed [221]. Cette combinaison a été utilisée dans la segmentation d'images histopathologiques pour séparer les noyaux touchants [222] qui sont considérés comme un seul objet après seuillage de la carte de probabilité. En bref, l'étape de post-traitement était principalement basée sur l'hypothèse que la probabilité postérieure à la bordure des noyaux en contact était systématiquement plus faible que dans le centre putatif du noyau, et que les centres des noyaux correspondent à un maximum local d'intensité dans l'image. La chute significative du signal entre le centre des noyaux et la bordure a été définie par la dynamique morphologique comme suit : soit LM un maximum local de la carte de probabilité \hat{y} à la sortie de Unet. LM représente un noyau cellulaire si, le long de tous les chemins P reliant LM à un certain maximum supérieur LM' , la diminution de \hat{y} est au moins égale à λ ,

$$\min_{\substack{P=(LM,\dots,LM') \\ \hat{y}(LM') > \hat{y}(LM)}} \{ \max_{x \in P} [\hat{y}(LM) - \hat{y}(x)] \} > \lambda, \quad (5.4)$$

où x est un pixel aux coordonnées (i, j) et λ est un paramètre libre optimisé pour chaque méthode de clarification (voir figure 5.3-B). La carte de segmentation finale a ensuite été obtenue en appliquant une transformation de type watershed à la carte de probabilité inversée ensemencée à partir des maxima qui remplissent ce critère.

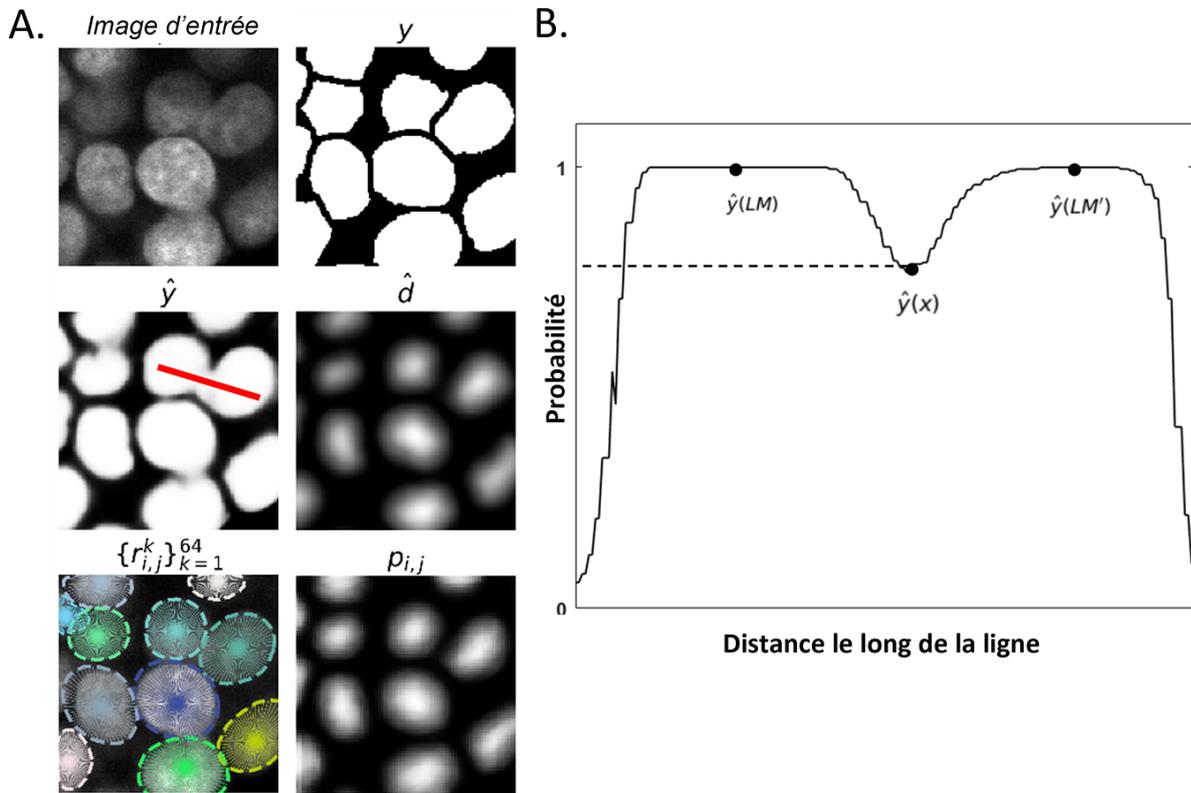


FIGURE 5.3 – Sorties des méthodes de segmentation par apprentissage profond. (A) Illustration d’un patch découpé d’une image de sphéroïde 2D et de son masque binaire de vérité terrain (y). Lors de la segmentation avec U-net, la sortie est la carte de probabilité inversée \hat{y} . \hat{d} est la carte de distance prédite à la sortie de Dist. $\{r_{i,j}^k\}_{k=1}^{64}$ et $P_{i,j}$ sont les distances prédites d’un pixel $x = (i, j)$ à la limite des noyaux le long d’un ensemble de directions radiales (trouvées empiriquement optimales à $\eta = 64$) et la carte de probabilité de l’objet à la sortie de Stardist respectivement. (B) Illustration du principe de post-traitement basé sur la morphologie dynamique.

5.6.3 Dist

Le problème dans les images 2D de sphéroïdes à haute densité de noyaux est que les noyaux qui se touchent et se chevauchent sont segmentés comme un seul objet. Plusieurs travaux ont été proposés pour résoudre ce problème en prédisant à la fois l’objet et ses contours [223, 224]. D’autres ont proposé de concentrer l’attention du modèle sur le cœur des noyaux en prédisant une version érodée de l’annotation, les centres correspondant à l’érosion ultime de la vérité terrain [225, 226]. Dans notre travail, et contrairement à la classification binaire par pixel utilisée précédemment, nous suivons le travail proposé dans [106] et nous avons transformé la classification des images 2D de sphéroïdes en un problème de régression en prédisant les cartes de distance (\hat{d}) qui se concentrent sur le centre des noyaux (voir figure 5.3-A). Par conséquent, pour chaque pixel $x = (i, j)$ de l’image binaire annotée (y), avec $y(x) > 0$,

nous attribuons une transformée de distance (D_c) représentant la distance au pixel d'arrière-plan le plus proche $x_b = [i_b, j_b]$. Ici, nous avons utilisé la distance de Chebyshev définie comme suit,

$$D_c = \max(|i_b - i|, |j_b - j|). \quad (5.5)$$

Le modèle Dist est basé sur la même architecture Unet décrite précédemment. Les mêmes hyperparamètres d'apprentissage ont été utilisés pour prédire les cartes de distance. Seule la fonction de sortie sigmoïde a été remplacée par la fonction ReLU au niveau du canal de sortie car les valeurs prédites sont supérieures à 1. La carte de segmentation binaire finale a ensuite été obtenue par seuillage des cartes de distance de sortie \hat{d} . La valeur de seuil notée β a également été optimisée pour les méthodes de clarification RapiClear, Contrôle et Glycérol. Enfin, l'étape de post-traitement décrite précédemment a également été appliquée aux cartes prédites afin d'améliorer la segmentation finale après avoir optimisé le paramètre λ pour chaque méthode de clarification.

5.6.4 Stardist

Les polygones convexes étoilés (Stardist), ou *Star-convex polygons en anglais*, est l'un des algorithmes robustes les plus utilisés pour la détection et la segmentation des cellules dans les images de microscopie en 2D. Il consiste à prédire un polygone convexe étoilé pour chaque pixel de noyau cellulaire $x = [i, j]$ en régressant les distances $\{r_{i,j}^k\}_{k=1}^\eta$ du pixel à la bordure des noyaux auxquels il appartient, le long d'un ensemble optimisé de directions radiales η avec des angles équidistants. De même, séparément, l'algorithme prédit la carte de probabilité $(p_{i,j})$ pour chaque pixel x comme la distance euclidienne normalisée par rapport au pixel du fond le plus proche $x_b = [i_b, j_b]$ (voir figure 5.3-A). Compte tenu de ces polygones candidats et des probabilités de noyaux qui leur sont associées, une suppression non-maximale (NMS, pour *non-maximal suppression*) a été effectuée pour atteindre l'ensemble final de polygones, chacun représentant un noyau cellulaire. Stardist est principalement basé sur l'architecture Unet avec 3 blocs pour les chemins de contraction et d'expansion, chacun composé de 2 couches convolutives avec $3 \cdot 2^n$ ($n = 0, 1, 2$) filtres de taille 3×3 , et une couche supplémentaire de 128 filtres ajoutée après la couche finale de caractéristiques Unet pour éviter que les deux couches de sortie suivantes doivent se disputer les caractéristiques. Les fonctions d'activation entre les couches sont ReLU et le nombre total de paramètres entraînaibles était d'environ 1.4 million de paramètres. Les couches de sortie de l'architecture sont constituées d'une couche convolutive à canal unique avec une fonction d'activation sigmoïde pour la carte de probabilité des noyaux et d'une couche de sortie pour les cartes des distances du polygone qui a autant de canaux qu'il y a de directions radiales

η et n'utilise pas de fonction d'activation supplémentaire.

Nous avons utilisé Stardist dans notre étude pour segmenter les noyaux cellulaires à l'intérieur des images de sphéroïdes en 2D. Pour les trois jeux de données, l'étape d'apprentissage a été réalisée avec les paramètres primaires suivants : *batch size* = 1, *epochs* = 400 et le taux d'apprentissage $lr = 0.3e^{-3}$. Ensuite, le meilleur modèle d'apprentissage qui minimise les fonctions de perte (équations (5.6) et (5.7)) a été sélectionné pour chaque condition. Ainsi, sur la base de ce critère, les hyper-paramètres des modèles sélectionnés pour les ensembles de données RapiClear, Contrôle et Glycérol étaient respectivement (*epochs* = 317, $lr = 0.75e^{-4}$), (*epochs* = 282, $lr = 1.5e^{-4}$) et (*epochs* = 380, $lr = 0.75e^{-4}$).

Finalement, et comme dans les méthodes de segmentation décrites précédemment, les paramètres : nombre de rayons η , seuil α de la carte de probabilité des noyaux et seuil de la suppression non-maximale τ , ont été optimisés pour chaque ensemble de données.

5.7 Fonctions de perte d'apprentissage et métriques d'évaluation de la segmentation

5.7.1 Fonctions de perte

L'objectif d'une fonction de perte dans un modèle d'apprentissage profond est de quantifier la différence entre les prédictions et les vérités terrain afin d'orienter l'entraînement du réseau. Dans notre travail, nous avons utilisé deux fonctions de perte couramment utilisées : l'entropie croisée binaire (*BCE*, pour *Binary Cross Entropy*) et l'erreur quadratique moyenne (*MSE*, pour *Mean Squared Error*) pour les problèmes de classification et de régression respectivement. Le *BCE* pour la classification binaire (noyaux et fond) est défini comme suit,

$$BCE(y, \hat{y}) = \frac{-1}{M} \sum_{m=1}^M y_m \cdot \log(\hat{y}_m) + (1 - y_m) \cdot \log(1 - \hat{y}_m), \quad (5.6)$$

et le *MSE* pour la prédiction de la carte de distance est défini selon l'équation suivante,

$$MSE(d, \hat{d}) = \frac{-1}{M} \sum_{m=1}^M (d_m - \hat{d}_m)^2, \quad (5.7)$$

où M est la taille de la carte de sortie 1D, \hat{y}_m et \hat{d}_m sont les m -ièmes valeurs scalaires dans les cartes de sortie prédites de sortie, y_m et d_m les valeurs cibles correspondantes

des cartes de probabilité et des cartes de distance respectivement.

5.7.2 Métriques d'évaluation de la performance de segmentation

Afin d'évaluer la performance de la segmentation des images de sphéroïdes et de pouvoir comparer quantitativement la transférabilité des modèles de segmentation entraînés sur l'une des méthodes de clarification à d'autres protocoles de clarification, nous avons utilisé la métrique (à l'échelle de pixel) F1-score [227] pour l'évaluation de la segmentation et également l'Aggregated Jaccard Index (AJI) [225] comme une métrique à l'échelle d'objet pour l'évaluation de la séparation des noyaux touchants. La mesure F1 est définie comme la moyenne harmonique entre le rappel et la précision au niveau du pixel et elle est calculée comme suit,

$$\text{F1-score} = 2 \cdot \frac{\text{Précision} \times \text{Rappel}}{\text{Précision} + \text{Rappel}}, \quad (5.8)$$

avec la $\text{Précision} = \frac{TP}{TP+FP}$ et le $\text{Rappel} = \frac{TP}{TP+FN}$, où TP , FP et FN sont respectivement le vrai positif, le faux positif et le faux négatif.

L'AJI est une extension de l'indice de Jaccard global, où chaque noyau de la vérité terrain est d'abord associé à un noyau détecté en maximisant l'indice de Jaccard. L'AJI correspond alors au rapport des sommes des cardinaux d'intersection et d'union de ces composants associés respectivement. En outre, toutes les composantes détectées qui ne sont pas assorties seront ajoutées au dénominateur. Plus formellement [106], l'AJI peut être définie comme,

$$\text{AJI} = \frac{\sum_{i=1}^L |G_i \cap S_k^*(i)|}{\sum_{i=1}^L |G_i \cup S_k^*(i)| + \sum_{l \in U} |S_l|}, \quad (5.9)$$

avec, G_i est une vérité terrain de noyau de L noyaux dans une image, S est l'ensemble des noyaux détectés, $S_k^*(i)$ est le noyau segmenté associé à G_i qui maximise l'indice de Jaccard, c'est-à-dire $S_k^*(i) = \operatorname{argmax}_k \frac{|G_i \cap S_k|}{|G_i \cup S_k|}$ et U est l'ensemble des indices des noyaux détectés qui n'ont été attribués à aucune vérité terrain.

5.8 Optimisation des hyper-paramètres

Une étape importante de l'apprentissage profond supervisé est l'optimisation des hyperparamètres. Cette étape d'optimisation a été appliquée au jeu de données de validation afin de maximiser les métriques de segmentation telles que le F1-score, l'AJI ou l'indice de Jaccard pour la méthode de segmentation Stardist. Dans notre travail, le seuil des cartes de probabilité α , le seuil des cartes de distance prédite β , la

valeur h-minima λ de l'étape de post-traitement de la reconstruction morphologique dynamique, le nombre de rayons des polygones convexes en étoile η et le seuil τ de la suppression non-maximale (nms) ont été optimisés empiriquement en faisant varier chaque paramètre entre une gamme de valeurs (voir figure 5.4). Ensuite, la valeur qui maximise une métrique de segmentation a été sélectionnée pour chaque méthode de segmentation en fonction des modèles de segmentation RapiClear, Contrôle et Glycérol, comme indiqué dans le tableau 5.1.

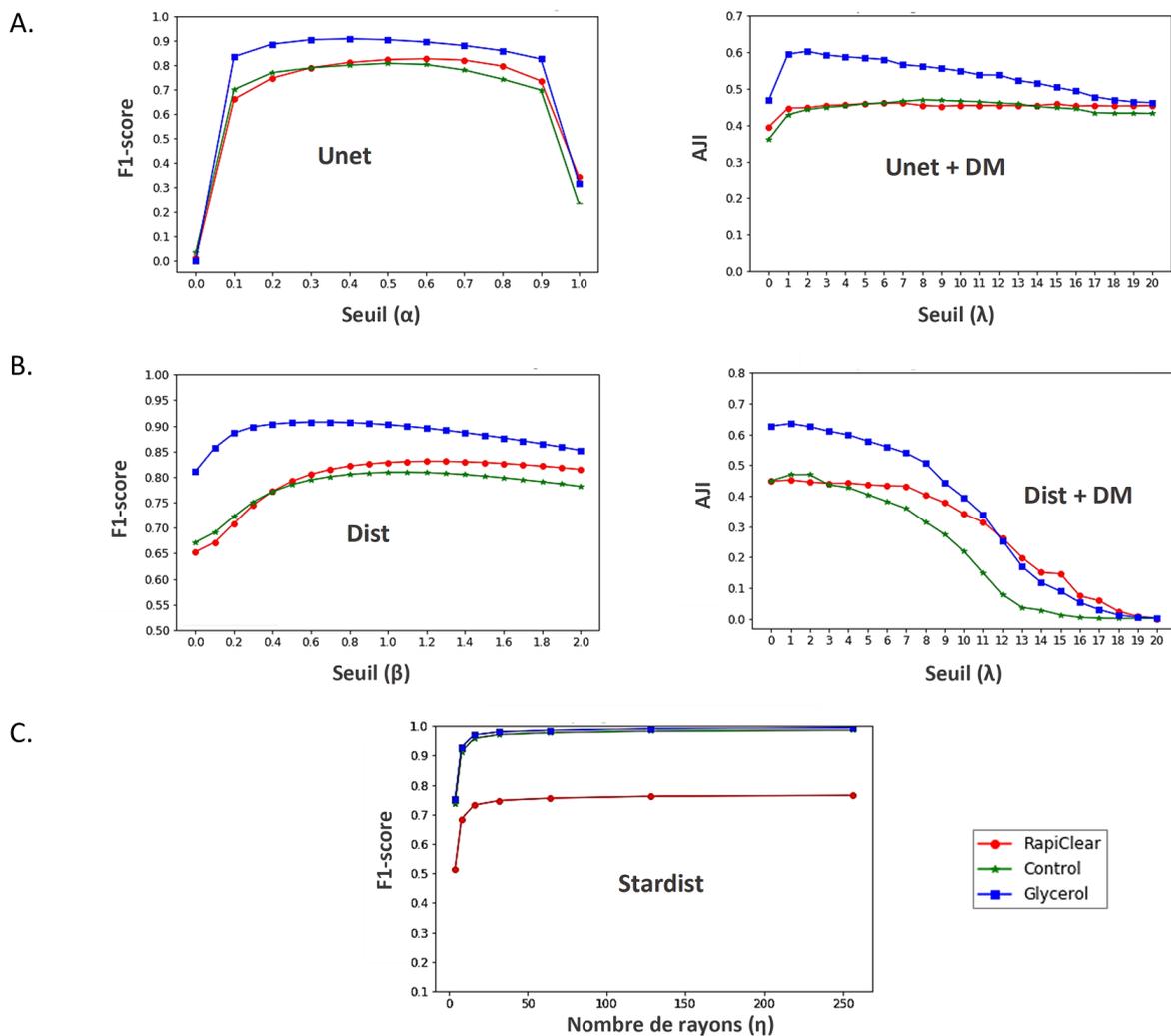


FIGURE 5.4 – Optimisation des hyperparamètres basée sur un ensemble de données de validation pour les modèles de segmentation Contrôle, RapiClear et Glycérol. Les graphiques montrent l'évolution du $F1 - score$ et de l'AJI en fonction des valeurs du (A) seuil de carte de probabilité α et du paramètre h-minima λ pour Unet et Unet+DM respectivement, (B) le seuil de carte de distance prédite β et la valeur h-minima λ pour Dist et Dist+DM et (C) la variation de la métrique $F1 - score$ en fonction du nombre de rayons η nécessaires pour reconstruire les polygones.

TABLEAU 5.1 – Étape d’optimisation des paramètres. Divers seuils ont été optimisés pour chaque méthode de segmentation utilisée entre une gamme de valeurs testées. La valeur du seuil qui maximise une métrique a été sélectionnée.

Paramètres	Méthodes de segmentation	Ranges	Métriques	Modèles de segmentation		
				Contrôle	RapiClear	Glycérol
α	Unet	$\alpha \in [0 \ 1]$	F1-score	0.5	0.6	0.4
	Stardist	$\alpha \in [0.3 \ 0.7]$	Indice de Jaccard	0.6	0.4	0.5
β	Dist	$\beta \in [0 \ 2]$	F1-score	1.1	1.2	0.6
λ	Unet + DM	$\lambda \in [0 \ 20]$	AJI	8	7	2
	Dist + DM			2	1	1
η	Stardist	$\eta \in 2^i, i \in [2 \ 8]$	F1-score	64		
τ		$\tau \in [0.3 \ 0.5]$	Indice de Jaccard	0.4	0.3	0.4

5.9 Apprentissage par transfert

Dans notre étude, nous avons utilisé la méthodologie de l’apprentissage par transfert [228] pour transférer les connaissances acquises lors de l’entraînement du modèle de segmentation sur un ensemble de données provenant d’une condition de clarification et d’appliquer le modèle pré-entraîné pour segmenter des images clarifiées avec d’autres conditions. Ceci a été fait par transfert direct des poids dans le réseau neuronal sans réglage spécifique.

5.10 Résultats et discussion

5.10.1 Comparaison des méthodes de clarification avec les métriques locales

Nous avons évalué l’efficacité des protocoles RapiClear et Glycérol sur la qualité de l’image en comparant leurs jeux de données avec des données non clarifiés (Contrôle) en utilisant des métriques de qualité locale de l’image. La qualité a été évaluée quantitativement en profondeur z sur les piles de sphéroïdes 3D en se basant sur le calcul de diverses métriques locales en utilisant des patches découpés à partir du centre du signal du sphéroïde dans chaque coupe (voir figure 5.2). Les mesures utilisées étaient le rapport signal/bruit (SNR) (équation (5.1)) et le rapport contraste/bruit (CNR) calculé de deux manières : à partir du coefficient de Bhattacharyya (BC) (équation (5.2)) et du rapport de Fisher (FR) (équation (5.3)). La figure 5.5 montre les plans xz au centre des sphéroïdes et les plans xy à une profondeur sélectionnée (de 70% à 100% du diamètre maximum, correspondant à la plage de profondeur où les trois conditions peuvent être comparées) ainsi que la moyenne et l’écart-type (std) de l’évolution de l’intensité moyenne normalisée (moyenne I/I_{max}) et des métriques locales calculées à partir de

trois sphéroïdes pour chaque condition Contrôle, RapiClear et Glycérol. Une inspection visuelle qualitative des plans xz et xy des sphéroïdes est fournie dans les panneaux A et B de la figure 5.5. L'évaluation quantitative de la qualité de l'image (figure 5.5-C) montre la dégradation de l'image avec la profondeur z.

En ce qui concerne les intensités, une baisse importante est enregistrée pour toutes les méthodes de clarification. Cette chute est plus prononcée dans les sphéroïdes non clarifiés (Contrôle). L'évolution de l'intensité en fonction de la profondeur est similaire pour le RapiClear et le Glycérol. Les métriques SNR et FR semblent presque constantes pour les trois conditions de clarification étudiées, tandis que BC montre une dégradation globale le long de la profondeur z. Pour les trois métriques SNR, FR et BC, Glycérol montre des valeurs significativement meilleures en comparaison avec RapiClear et Contrôle. Cependant, il est difficile de produire une prédiction sûre de l'effet de clarification le long de l'axe z avec des métriques locales. C'est pourquoi il était également important de confronter ce que l'on trouverait avec les métriques locales conventionnelles dans une perspective d'apprentissage automatique.

5.10.2 Segmentation des images 2D des sphéroïdes

Nous avons utilisé des méthodes de segmentation par apprentissage profond pour caractériser la qualité des protocoles de clarification des sphéroïdes. Plusieurs méthodes de segmentation telles que Unet, Dist et Stardist, associées à des étapes de post-traitement basées sur la reconstruction de la morphologie dynamique et l'algorithme de Watershed (DM) ont été appliquées aux images de la figure 5.5-B produites à partir des conditions de clarification testées. Nous avons utilisé le F1-score pour quantifier la qualité de la segmentation en tant que métrique à l'échelle du pixel et l'indice de Jaccard agrégé (AJI) en tant que métrique à l'échelle de l'objet. Nous avons considéré le test de segmentation maximisant les métriques (score F1, AJI) comme la meilleure méthode de segmentation. Nous avons testé l'efficacité de la segmentation pour deux cas : (i) lorsque les images de test et les modèles de segmentation pré-entraînés proviennent de la même méthode de clarification et (ii) de manière croisée en prenant les images de test d'une condition de clarification et en utilisant le modèle pré-entraîné d'une autre. Le tableau 5.2 montre les valeurs moyennes et les écarts types (std) du F1-score et de l'AJI calculés pour les images de test situées à 70, 80, 90, 95 et 100% du diamètre maximal le long de z.

Il est intéressant de noter que, conformément à l'observation enregistrée par les métriques de qualité locales, le protocole de clarification Glycérol fournit la meilleure performance de segmentation dans toutes les configurations testées avec un F1-score

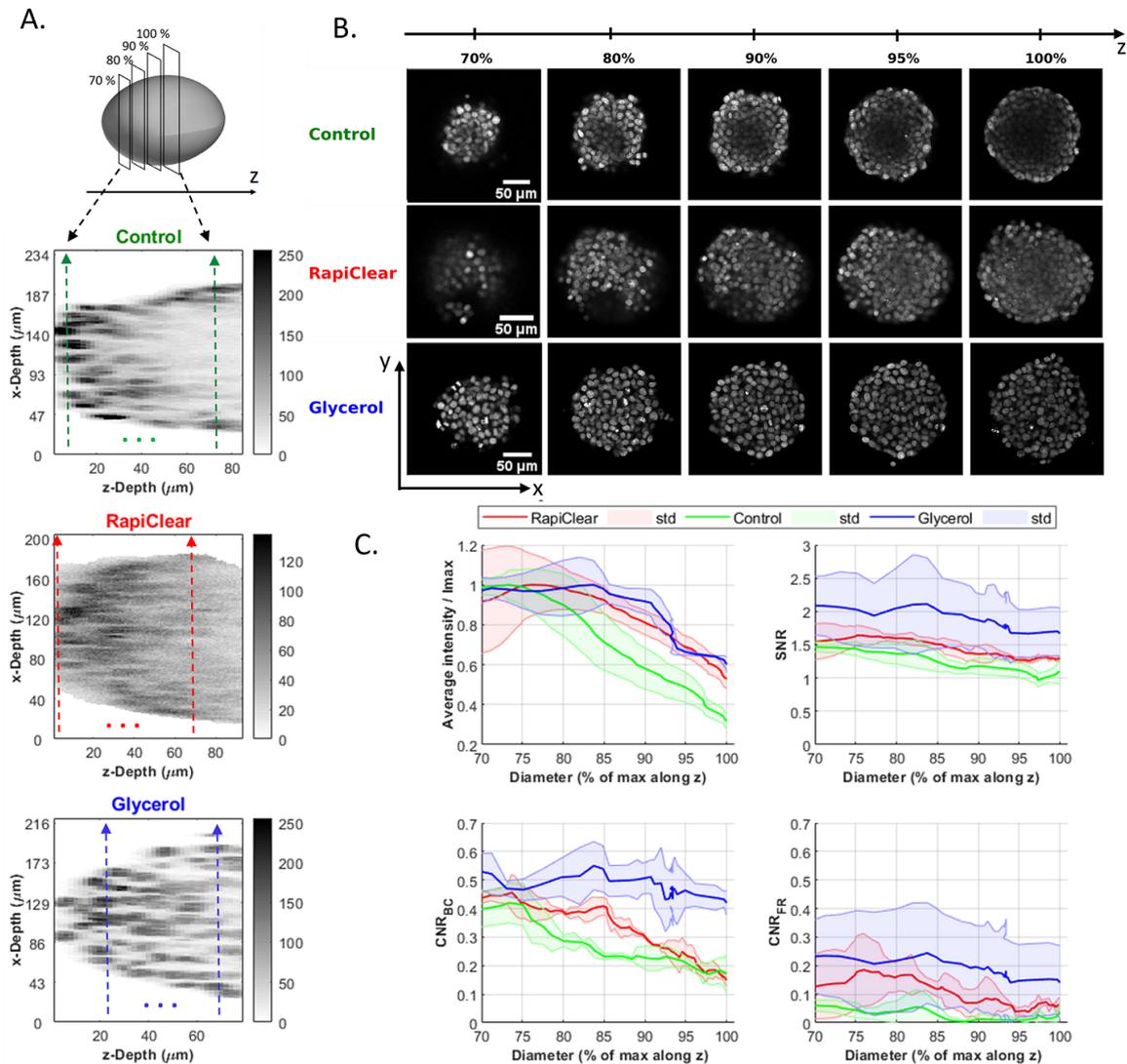


FIGURE 5.5 – Analyse de la qualité des images de sphéroïdes en fonction de la profondeur (z) définie comme le pourcentage du diamètre maximal pour les ensembles de données produits avec les méthodes de clarification Contrôle, RapiClear et Glycérol. Les tranches avec 100% de diamètre sont considérées comme le centre des sphéroïdes 3D. (A) Illustration des tranches de xz . Les lignes pointillées colorées correspondent à l'emplacement (en μm) des tranches xy ayant 70% et 100% de diamètre maximal. (B) Visualisation des images de test (tranches xy) normalisées en profondeur (z) et utilisées pour évaluer les performances de segmentation pour chaque méthode de clarification. (C) Moyenne et écart-type (std) de l'intensité moyenne, SNR, CNR_{BC} par Battacharayya et CNR_{FR} par Fisher calculés pour 3 sphéroïdes pour chaque méthode de clarification et tracés en fonction du pourcentage du diamètre maximal.

maximum=0.91 et un AJI=0.71 trouvé lorsque la méthode de segmentation Dist suivie d'un post-traitement (DM) est utilisée (tableau 5.2 C-3). En outre, il est remarquable que le modèle de segmentation Glycérol est également puissant pour segmenter l'ensemble de données non clarifiée de la condition Contrôle avec des résultats supérieurs aux

valeurs du modèle Contrôle. Par exemple, les métriques de segmentation sont (F1-score=0.86, AJI=0.55) pour le test Contrôle-Glycérol (tableau 5.2 A-3) et (F1-score=0.85, AJI=0.52) pour le test Contrôle-Contrôle (tableau 5.2 A-2) lorsque la méthode Dist+DM est utilisée. Il est également remarquable que les résultats de la segmentation des images de test de Contrôle et RapiClear donnent des F1-scores et des valeurs AJI plus élevés avec les modèles de segmentation entraînés sur le Glycérol qu'avec les modèles entraînés sur leurs données. Comme le montre la figure 5.5, ces résultats moyens sont presque stationnaires le long de z pour toutes les méthodes de clarification testées (voir également l'illustration qualitative de la segmentation finale dans les figures 5.10 et 5.11.A). Ceci prouve que l'évolution locale de l'intensité ou du SNR montrée dans la figure 5.5 n'est pas nécessairement en corrélation avec les performances de la segmentation.

5.10.3 Transférabilité des modèles de segmentation à d'autres ensembles de données

Enfin, nous avons testé la transférabilité des informations des ensembles de données clarifiés à d'autres ensembles de données en segmentant des images de test provenant d'une autre méthode de clarification, d'une autre structure et d'un autre système d'imagerie en utilisant des modèles de segmentation pré-entraînés de Contrôle, RapiClear et Glycérol. Pour cette étude, nous avons utilisé des images de test de lignées cellulaires de carcinome colorectal HCT-116 clarifiées avec TDE et acquises avec un système confocal à balayage laser (Nikon). Nous avons également sélectionné deux ensembles de données de la littérature, tels que les cellules de carcinome mammaire T47D clarifiées avec la méthode ScaleS et acquises avec un système confocal à disque rotatif (Opera Phenix) [93] et la lignée cellulaire de carcinome colorectal HCT-116 clarifiées avec la méthode CUBIC et acquise avec un microscope à fluorescence à feuille de lumière (LSF) [217].

Le tableau 5.2 D,E,F montre la moyenne et l'écart type des métriques F1-score et AJI calculé pour chaque image de test produite par les méthodes de clarification TDE, ScaleS et CUBIC et segmentée avec les modèles pré-entraînés Contrôle, RapiClear et Glycérol. Les résultats de segmentation sont élevés pour TDE et ScaleS (voir tableau 5.2 et figure 5.7-A). De façon similaire à ce qui a été trouvé pour RapiClear et Contrôle, le Glycérol apparaît, pour TDE et ScaleS également, comme la meilleure méthode sur laquelle s'entraîner pour bénéficier de l'apprentissage par transfert. Cette expérience prouve clairement la faisabilité du transfert d'informations par clarification numérique d'une méthode de clarification à une autre acquise avec le même système d'imagerie

TABLEAU 5.2 – Moyenne et écart-type de la métrique de segmentation calculée (F1-score, AJI) pour cinq images de test produites à partir de Contrôle, RapiClear et Glycérol. Les tests sont réalisés de manière croisée entre les modèles de segmentation (A, B et C). Aussi, ils sont réalisés pour cinq images de test produites à partir de TDE, ScaleS et CUBIC pour tester la transférabilité des données d’un protocole de clarification à un autre (D, E et F). Les cellules de couleur grise représentent les valeurs de paires les plus élevées de (F1-score, AJI) pour le meilleur modèle de segmentation pour chaque ensemble de données de méthode de clarification. À l’exception de la méthode de clarification Cubic où toutes les méthodes fournissent de faibles performances, Glycérol apparaît comme la meilleure méthode sur laquelle on devrait entraîner les modèles d’apprentissage profond afin de bénéficier de la clarification numérique.

Test data	Segmentation models	F1-score \pm std			AJI \pm std				
		<i>Unet</i>	<i>Dist</i>	<i>Stardist</i>	<i>Unet</i>	<i>Unet+DM</i>	<i>Dist</i>	<i>Dist + DM</i>	<i>Stardist</i>
Contrôle (A)	Contrôle (1)	0.85 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.07 ± 0.06	0.51 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.59 ± 0.03
	RapiClear (2)	0.84 ± 0.02	0.85 ± 0.01	0.72 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.52 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.42 ± 0.07
	Glycérol (3)	0.86 ± 0.02	0.86 ± 0.01	0.84 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.57 ± 0.05	0.06 ± 0.04	0.55 ± 0.02	0.55 ± 0.06
RapiClear (B)	Contrôle (1)	0.82 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.47 ± 0.05	0.52 ± 0.03
	RapiClear (2)	0.83 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.76 ± 0.03	0.11 ± 0.09	0.46 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.43 ± 0.06
	Glycérol (3)	0.83 ± 0.03	0.83 ± 0.02	0.80 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.03
Glycérol (C)	Contrôle (1)	0.89 ± 0.01	0.89 ± 0.01	0.89 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.46 ± 0.06	0.64 ± 0.03	0.68 ± 0.02
	RapiClear (2)	0.88 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.40 ± 0.07	0.63 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.62 ± 0.02	0.51 ± 0.03
	Glycérol (3)	0.91 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.90 ± 0.01	0.34 ± 0.07	0.70 ± 0.02	0.47 ± 0.05	0.71 ± 0.02	0.70 ± 0.02
TDE (D)	Contrôle (1)	0.88 ± 0.01	0.88 ± 0.02	0.84 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.44 ± 0.07	0.06 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.59 ± 0.04
	RapiClear (2)	0.89 ± 0.01	0.89 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.60 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.60 ± 0.02	0.52 ± 0.06
	Glycérol (3)	0.90 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.84 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.39 ± 0.05	0.02 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.58 ± 0.04
ScaleS (E)	Contrôle (1)	0.85 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.29 ± 0.13	0.54 ± 0.03	0.39 ± 0.1	0.59 ± 0.05	0.62 ± 0.05
	RapiClear (2)	0.85 ± 0.06	0.85 ± 0.05	0.77 ± 0.06	0.22 ± 0.1	0.58 ± 0.03	0.26 ± 0.13	0.58 ± 0.06	0.50 ± 0.06
	Glycérol (3)	0.87 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.12 ± 0.07	0.57 ± 0.04	0.14 ± 0.11	0.56 ± 0.05	0.63 ± 0.03
CUBIC (F)	Control (1)	0.68 ± 0.002	0.69 ± 0.03	0.24 ± 0.04	0.003 ± 0.001	0.33 ± 0.04	0.004 ± 0.001	0.16 ± 0.04	0.07 ± 0.02
	RapiClear (2)	0.66 ± 0.01	0.63 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.003 ± 0.001	0.23 ± 0.03	0.003 ± 0.001	0.19 ± 0.02	0.11 ± 0.001
	Glycerol (3)	0.58 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.26 ± 0.04	0.002 ± 0.001	0.23 ± 0.04	0.002 ± 0.001	0.16 ± 0.01	0.06 ± 0.01

mais avec une structure et une échelle de données différentes. En revanche, l’ensemble de données CUBIC acquises avec la microscopie à fluorescence à feuille de lumière (LSF) et présentant un contraste et des artefacts très différents montre une faible

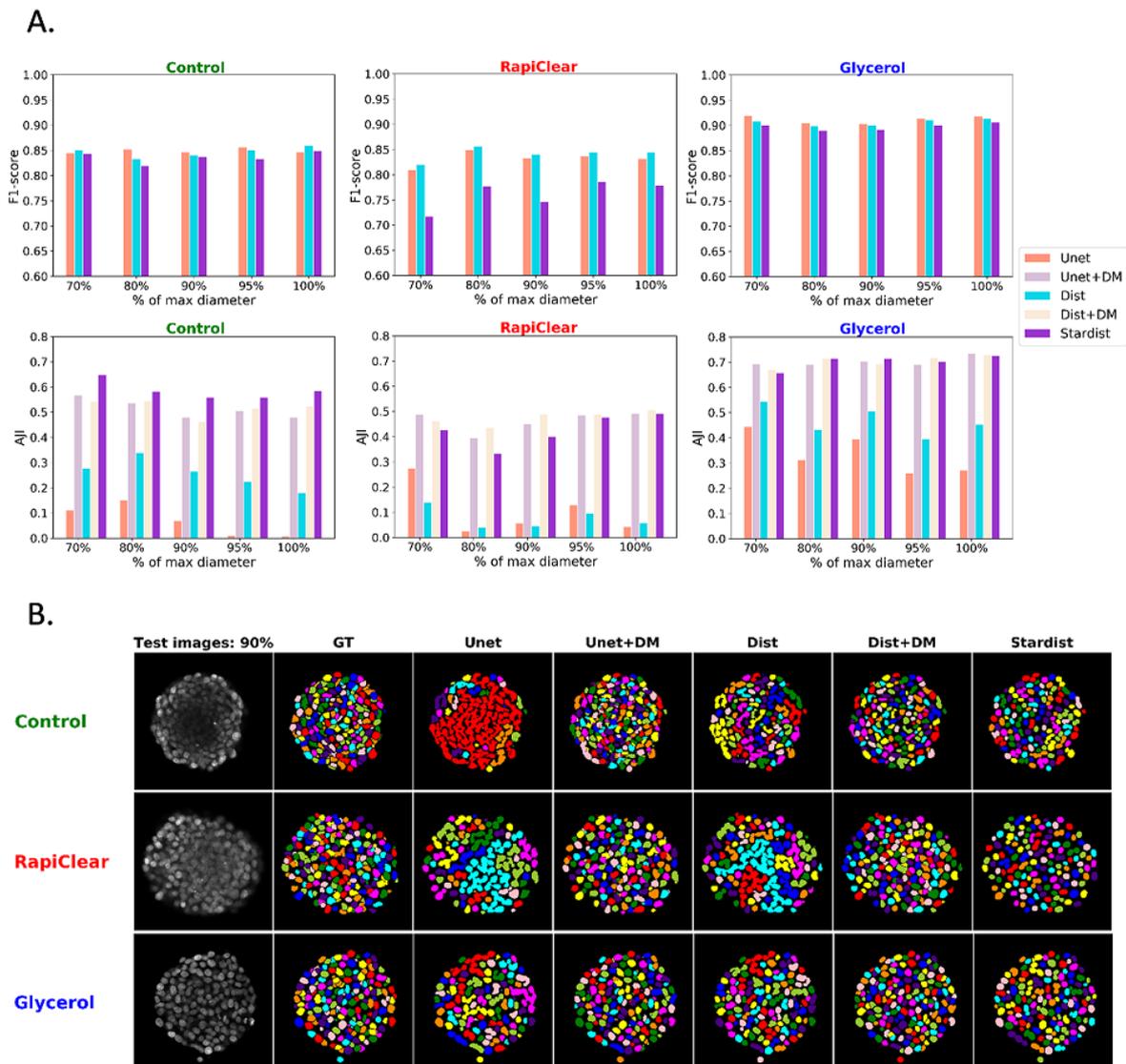


FIGURE 5.6 – Résultats de la segmentation en fonction des profondeurs (z). **(A)** Résultats quantitatifs de la segmentation (F1-score, AJI) pour les cinq images tests prises à des profondeurs allant de 70, 80, 90, 95 et 100% définies comme le pourcentage du diamètre maximal. Les méthodes de segmentation sont entraînées et testées sur la même méthode de clarification. **(B)** Illustration qualitative de la segmentation finale des tranches à 90% du diamètre maximal produite par les méthodes de clarification Contrôle, RapiClear et Glycérol.

performance. Cette expérience montre la limite de la transférabilité (voir figure 5.7-B et les figures 5.11-B et 5.12 pour une illustration qualitative des cartes de segmentation finales).

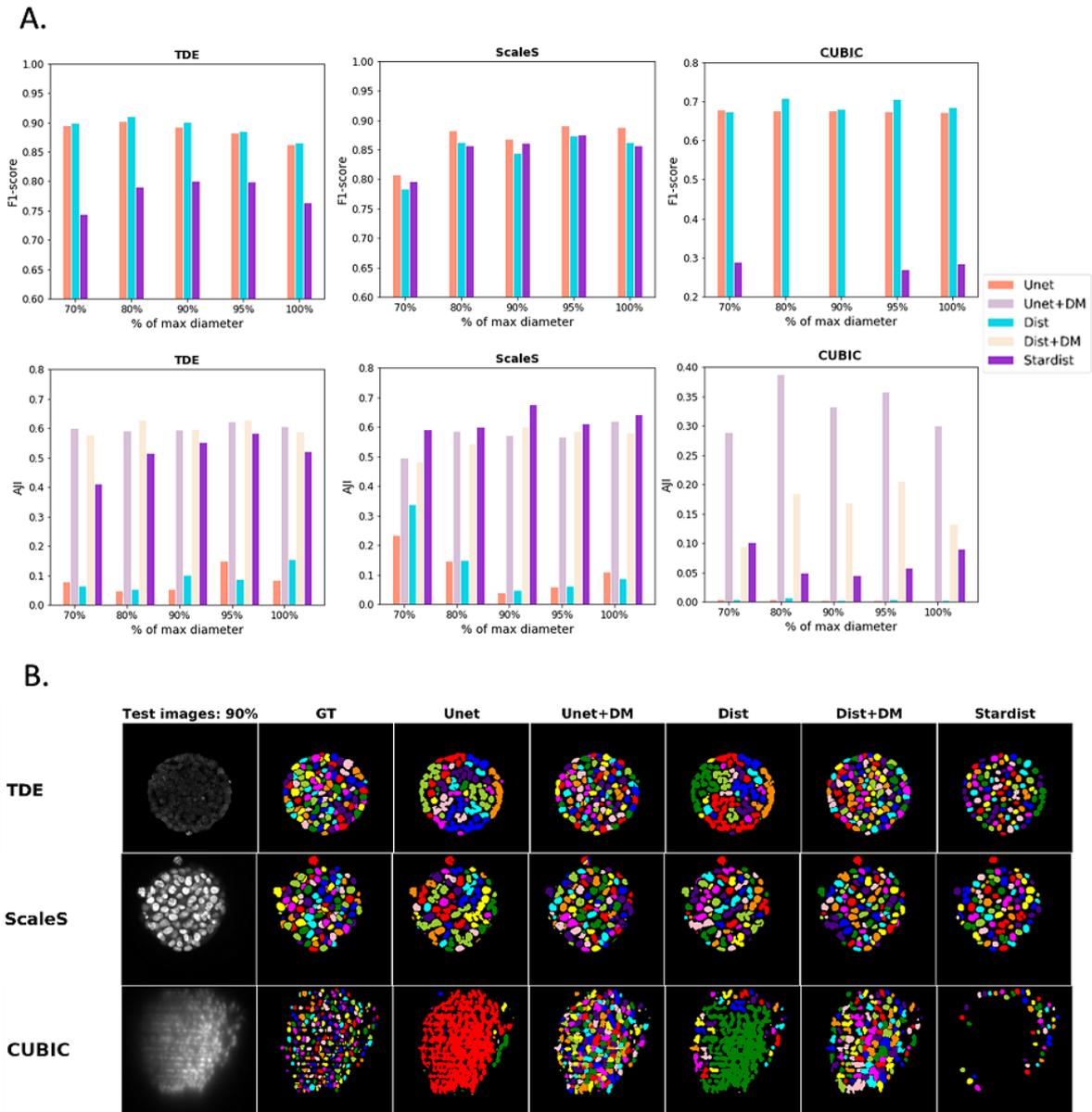


FIGURE 5.7 – Évaluation de la transférabilité des données : résultats de la segmentation en fonction des profondeurs (z) définies comme le pourcentage du diamètre maximal. (A) Résultats quantitatifs de la segmentation (F1-score, AJI) pour les cinq images de test produites à partir des méthodes de clarification TDE, Scales et CUBIC et segmentées à l'aide des modèles de segmentation RapiClear, Glycérol et Contrôle respectivement. (B) Illustration qualitative des résultats de la segmentation finale pour les tranches à 90% du diamètre maximal.

5.10.4 Faisabilité de la clarification numérique des sphéroïdes

La section précédente sur la transférabilité des données impose de se concentrer sur un transfert d'intérêt spécifique, à savoir la possibilité de transférer des connaissances de données clarifiées à des données non clarifiées (Contrôle). Nous appelons cet

apprentissage du transfert : "clarification numérique". Pour étudier cette clarification numérique, nous avons utilisé un ensemble de 5 nouveaux sphéroïdes, qui ont été imagés d'abord avant clarification (contrôle), puis après clarification avec Rapiclear, et enfin après clarification avec Glycérol. Grâce aux microsystemes à base d'agarose, il est possible de changer de solution sans perdre les sphéroïdes, ce qui permet d'imager exactement les mêmes sphéroïdes après les différentes procédures de clarification. Nous avons utilisé le comptage des noyaux comme métrique pour définir l'efficacité de la clarification numérique. Nous avons pris comme référence les noyaux détectés par la méthode de clarification la mieux identifiée, c'est-à-dire la condition Glycérol. Pour cette expérience, les cartes de segmentation ont été filtrées en supprimant les composants connectés inférieurs à 200 pixels. La figure 5.8-A,B,C illustrent l'intérêt qualitatif de la clarification numérique disponible à la sortie des réseaux neuronaux lorsque le meilleur réseau neuronal de segmentation (segmentation Dist) est entraîné sur la meilleure méthode de clarification (Glycérol) et appliqué à des données non clarifiées ou clarifiées avec Rapiclear. Il est évident que l'atténuation de l'intensité enregistrée avec la métrique locale le long de z peut être compensée avec le réseau neuronal profond grâce à la compensation numérique. Comme le montrent la figure 5.8-D,E en comparaison avec la vérité de terrain, une amélioration significative du comptage des cellules le long de z est apportée par l'entraînement sur des images obtenues avec la meilleure méthode de clarification, alors que le modèle est appliqué directement sur le contrôle ou sur une méthode de clarification moins efficace. Comme le soulignent les flèches noires, le nombre de noyaux dans les sphéroïdes RapiClear a été complètement compensé par un modèle entraîné sur le Glycérol. De plus, une amélioration d'environ $20 \mu\text{m}$ de la gamme de segmentation correcte pour les sphéroïdes Contrôle a été trouvée lorsque la clarification numérique est appliquée. Ces résultats spécifiques prouvent l'intérêt de la clarification numérique des sphéroïdes qui permet d'étendre la plage de segmentation correcte sans avoir recours à une clarification chimique.

En outre, une reconstruction 3D des sphéroïdes segmentés a été réalisée pour le comptage des noyaux en 3D. Cette étape est effectuée sur une version érodée des cartes de segmentation finales pour séparer les cellules touchantes dans la direction z en appliquant une ouverture 3D par filtrage morphologique. Nous avons utilisé des sphères comme des éléments structurants de taille $X = 8$, $Y = 8$, $Z = 4$ pixels équivalents à la taille moyenne mesurée des cellules détectées. En comparant le nombre de noyaux 3D détectés dans les sphéroïdes clarifiés avec le Glycérol, le nombre de noyaux 3D reconstruits présenté dans la figure 5.9-D montre les améliorations apportées par la clarification numérique pour les sphéroïdes RapiClear et Contrôle. Une illustration d'un sphéroïde (avant et après clarification) et la reconstruction 3D est présentée dans

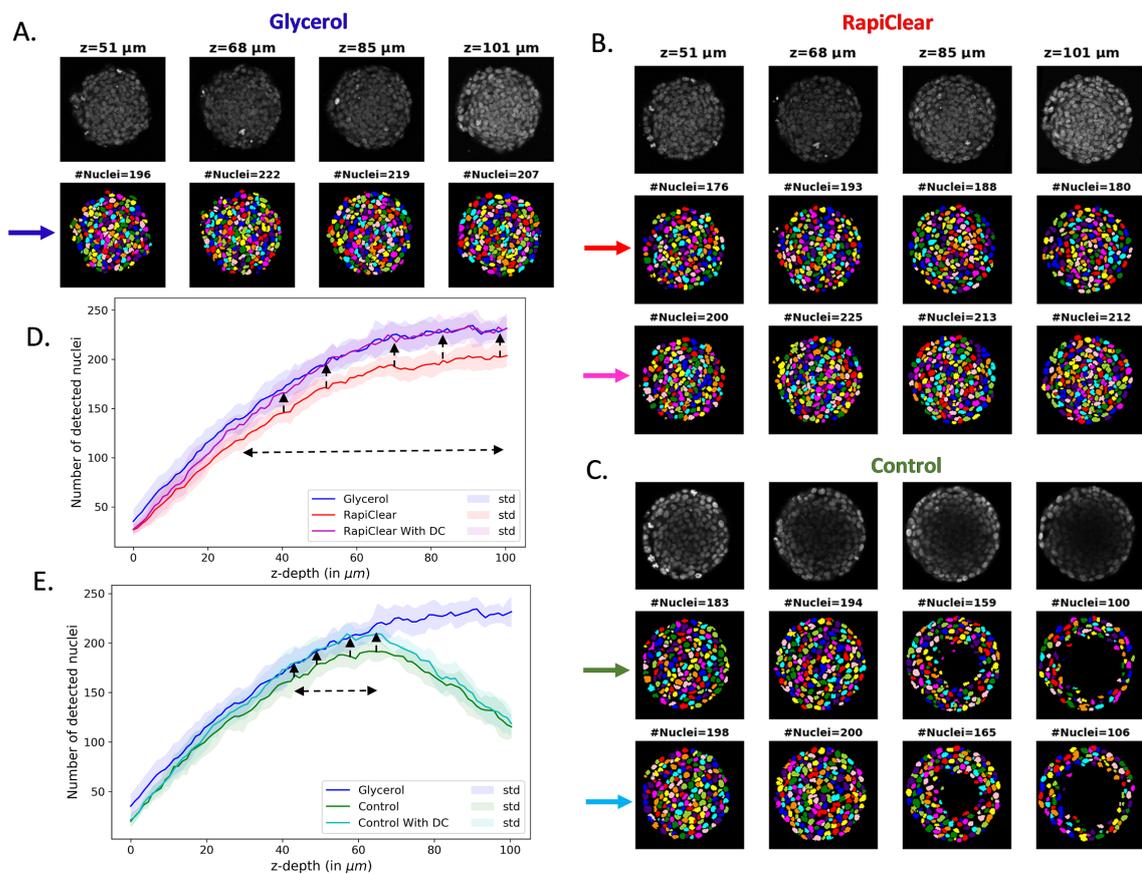


FIGURE 5.8 – Analyse de l’effet de la clarification numérique. Cartes de segmentation à la sortie de l’architecture U-net pour la méthode de segmentation Dist calculées pour (A) un sphéroïde clarifié avec Glycérol, (B) le même sphéroïde clarifié avec RapiClear et (C) le sphéroïde non clarifié (Contrôle) pour différentes profondeurs z (μm). (D) Moyenne et écart-type du nombre de noyaux détectés en 2D calculés à partir 5 sphéroïdes en fonction de la profondeur z (μm) pour les sphéroïdes clarifiés avec RapiClear et segmentés avec le modèle RapiClear (ligne rouge) ou avec la clarification numérique (ligne magenta). (E) La moyenne et l’écart-type du nombre de noyaux détectés en 2D calculés à partir des mêmes 5 sphéroïdes de en fonction de la profondeur z (μm) pour les sphéroïdes non clarifiés segmentés avec le modèle Contrôle (ligne verte) ou avec la clarification numérique (ligne cyan). Le Glycérol a été utilisé comme référence (ligne bleue).

la figure 5.9-A,B,C. Ici encore, dans le cas de la clarification numérique du Glycérol au RapiClear, le nombre total de cellules est presque parfaitement récupéré. Pour le clarification numérique du Glycérol au Contrôle, quelques 38 cellules supplémentaires sont segmentées sans besoin de clarification chimique en comparaison avec la segmentation appliquée sans l’aide de l’apprentissage profond.

5.11 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'intérêt d'une perspective d'apprentissage profond pour la comparaison de méthodes de clarification en microscopie de fluorescence. Ceci a été illustré pour une tâche de segmentation des noyaux dans des sphéroïdes 3D visualisés par microscopie de fluorescence. La meilleure méthode de clarification identifiée avec la métrique locale conventionnelle suit les performances des méthodes de segmentation basées sur l'apprentissage profond les plus récentes. Cependant, comme les ensembles de données d'entraînement comprennent des images de différentes profondeurs, aucune influence réelle de la profondeur n'a été observée sur les performances de segmentation, contrairement à ce qui a été constaté avec la métrique locale. Cela démontre que la métrique locale peut être utilisée pour sélectionner une méthode de clarification optimale mais que les performances finales peuvent être rendues invariantes au bruit grâce à des stratégies d'apprentissage automatique adéquates.

Nous avons spécialement testé l'intérêt de l'apprentissage par transfert dans ce contexte. Nous avons étudié l'intérêt d'entraîner le modèle sur une condition de clarification et de tester sur une autre. Nous avons également constaté que la meilleure méthode de segmentation était celle qui donnait les meilleurs résultats de transfert. Ceci est particulièrement intéressant lorsque les images de test sont produites dans des conditions non clarifiées. L'entraînement d'un modèle sur les meilleures conditions de clarification permet de réaliser la segmentation des noyaux dans des conditions non clarifiées avec de meilleures performances. Cela ouvre la voie à la clarification numérique des échantillons. Des images annotées de haute qualité produites avec des protocoles coûteux en temps pourraient permettre à quiconque de débruiter des images acquises avec des protocoles beaucoup plus simples.

Ces résultats pourraient être étendus dans diverses directions. L'inférence de l'approche de segmentation proposée est très rapide (environ 2 minutes pour une pile de 41 tranches de 40 Mbs avec un processeur Intel Core i7-6700HQ CPU @ 2.60 GHz). Elle peut être facilement utilisée pour la segmentation à la volée pendant l'acquisition d'échantillons fixes, ainsi que pour l'imagerie en direct (pour les expériences où les échantillons sont acquis sur une longue période de temps [des dizaines d'heures], mais avec des intervalles de temps assez longs [supérieurs à 10 minutes]). En mettant directement à disposition de l'utilisateur une telle métrique à l'échelle des cellules uniques, nous ouvrons la voie à des applications prometteuses pour le dépistage de médicaments dans un environnement 3D plus proche de celui in-vivo. Les sphéroïdes du cancer colorectal ont été utilisés ici à titre d'exemple. La méthode est également dis-

ponible pour les organoïdes qui sont apparus comme des modèles *in vitro* très puissants pour imiter diverses situations normales et pathologiques [229, 230]. La méthode peut également être facilement étendue à la segmentation d'autres structures biologiques d'intérêt, telles que les formes globales des cellules, à condition que les ensembles de données segmentées manuellement soient mis en oeuvre. D'autres méthodes de clarification spécialement optimisées pour les échantillons épais [85, 231, 232, 233] pourraient alors être également testées avec la même approche globale présentée dans ce chapitre. Le résultat le plus prometteur résidait dans la possibilité d'une clarification numérique. Dans cette étude, nous l'avons réalisée, pour une première démonstration, en nous entraînant directement sur la meilleure méthode de clarification. Des variantes pourraient être envisagées, comme le transfert de style [234, 235] ou l'adaptation de domaine, afin d'améliorer encore la clarification numérique des échantillons. De plus, nous avons démontré la possibilité d'une clarification numérique par apprentissage de transfert même lorsque les deux microscopes utilisés ne sont pas strictement identiques. Ceci nécessite une étude quantitative systématique pour évaluer la robustesse de cette découverte avec des microscopes de différentes résolutions et aberrations.

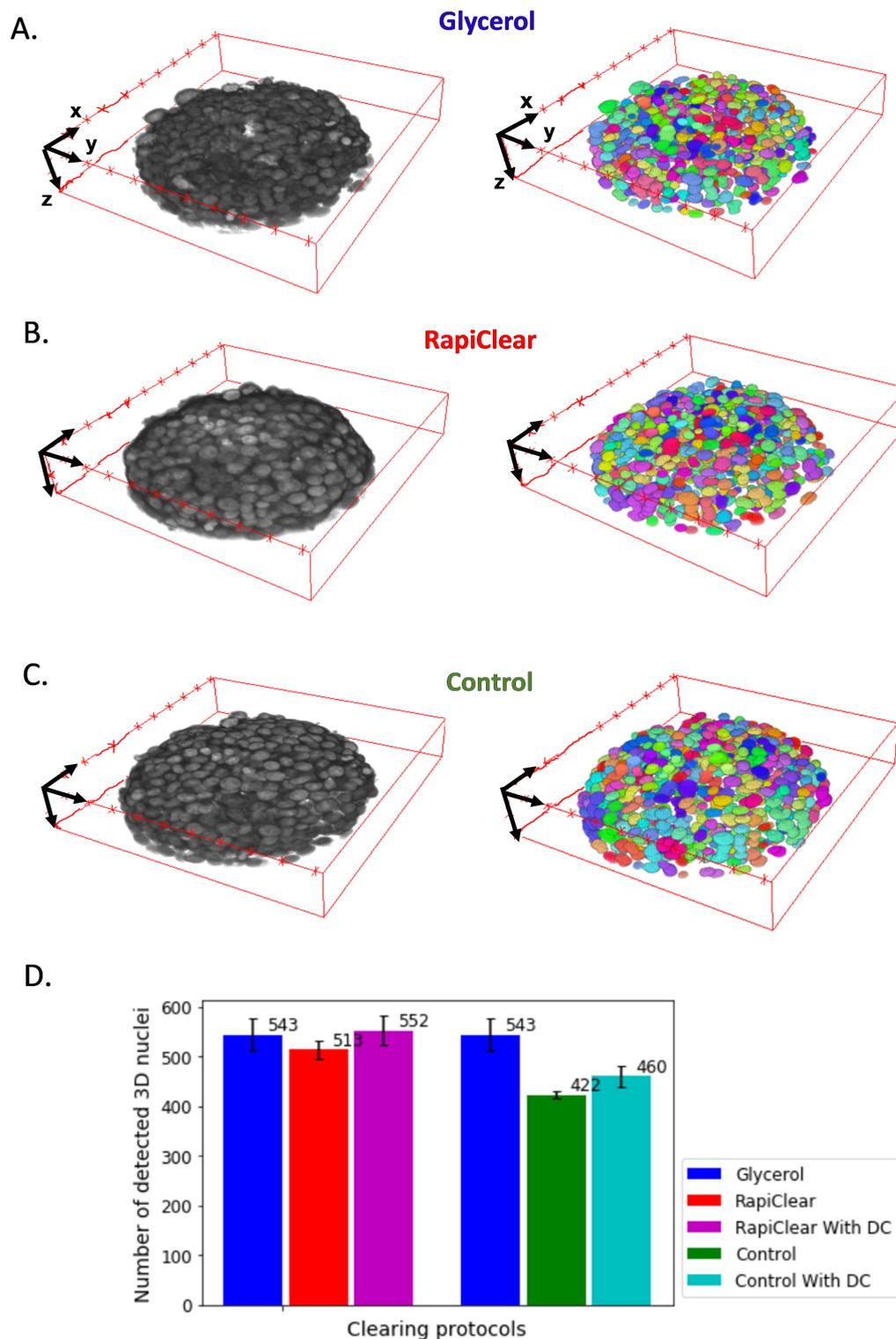


FIGURE 5.9 – Reconstruction 3D et comptage de noyaux en 3D. (A) Illustration d'un sphéroïde clarifié avec la méthode Glycérol et la reconstruction 3D des cartes de segmentation. (B) Le même sphéroïde clarifié avec RapiClear et la reconstruction 3D après la clarification numérique. (C) Le même sphéroïde non clarifié et la reconstruction 3D après la clarification numérique. (D) La moyenne et les valeurs d'écart types des noyaux comptés en 3D des 5 sphéroïdes testés avec et sans clarification numérique. Le glycérol a été utilisé comme référence (barres bleues).

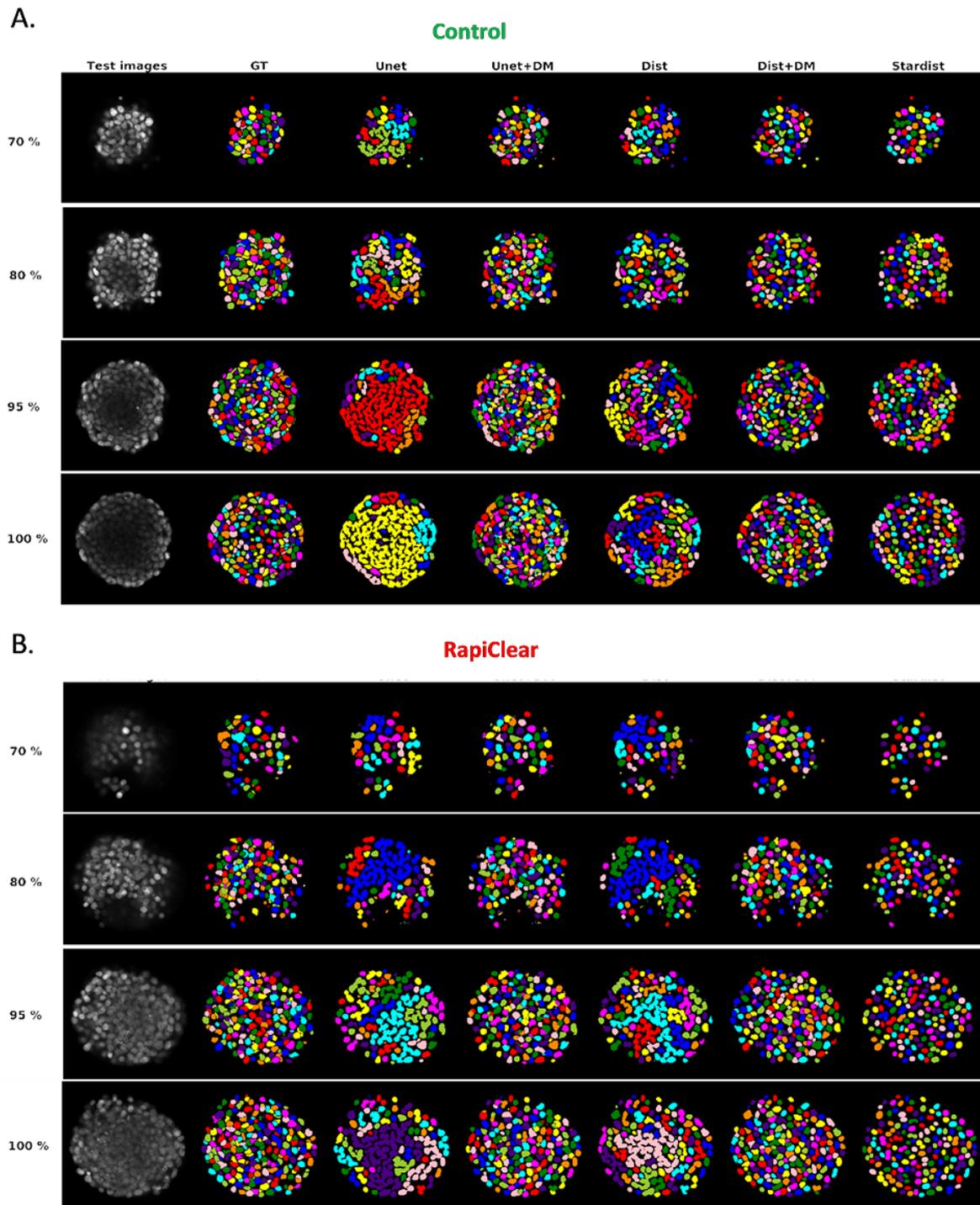


FIGURE 5.10 – Cartes de segmentation finales pour les images de contrôle et RapiClear. Illustration des résultats de segmentation finaux de toutes les méthodes de segmentation utilisées pour les coupes à 70, 80, 95 et 100% du diamètre maximal (profondeur z). (A) Pour les images de Contrôle et (B) RapiClear.

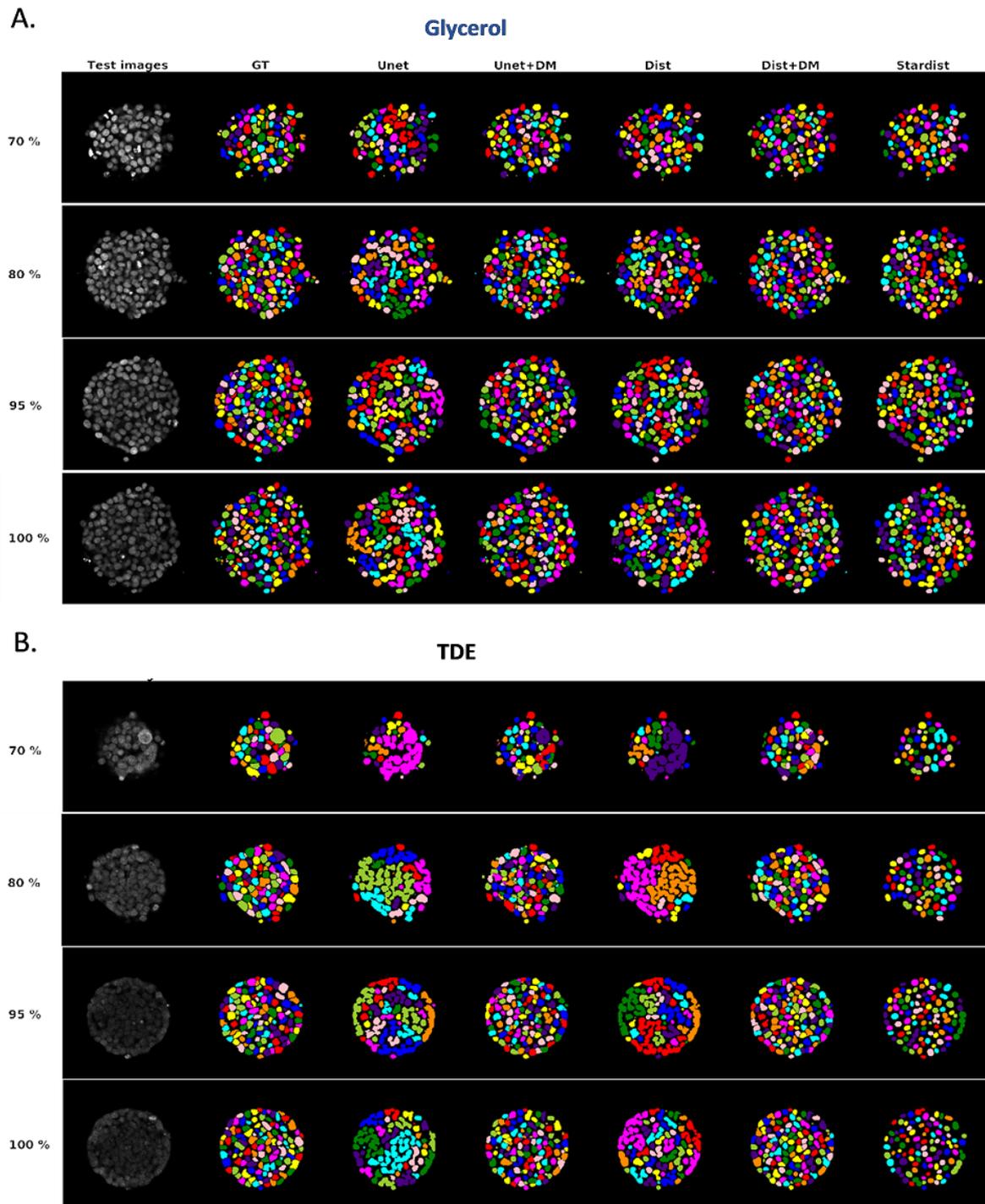


FIGURE 5.11 – Cartes de segmentation finale pour les images Glycérol et TDE. Illustration des résultats de segmentation finaux de toutes les méthodes de segmentation utilisées pour les tranches à 70, 80, 95 et 100% du diamètre maximum (profondeur z). (A) Pour les images de test Glycérol et (B) images de test TDE segmentées à l'aide du modèle RapiClear pendant le test de transférabilité des données.

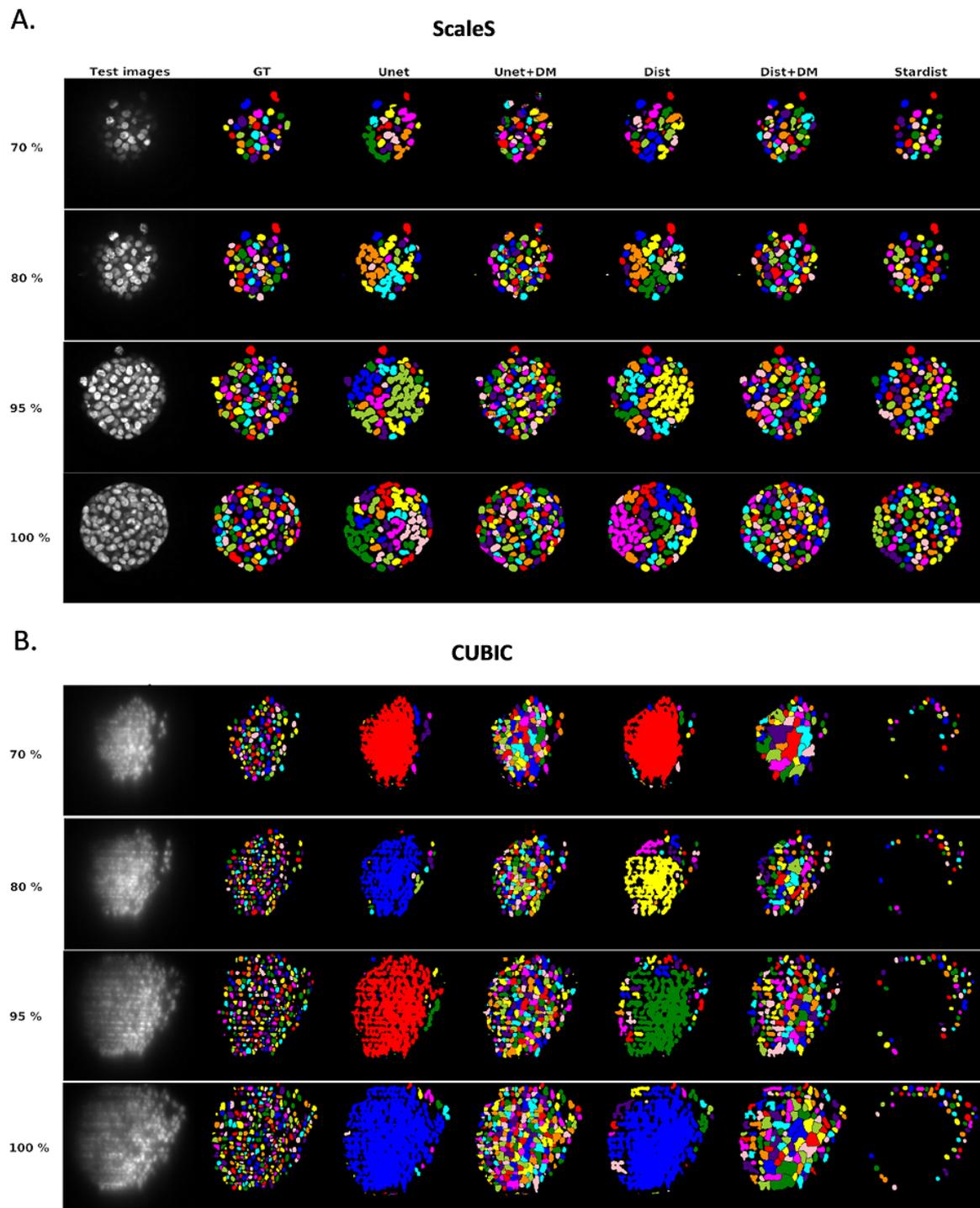


FIGURE 5.12 – Cartes de segmentation finale pour les images ScaleS et CUBIC. Illustration des résultats de segmentation finaux de toutes les méthodes de segmentation utilisées pour les tranches à 70, 80, 95 et 100% du diamètre maximum (profondeur z). (A) Pour les images de test ScaleS segmentées à l'aide du modèle Glycérol et (B) images de test CUBIC segmentées à l'aide du modèle Contrôle pendant le test de transférabilité des données.

Conclusion et perspectives

Ce chapitre synthétise les principaux résultats développés durant ces trois années de thèse, et met l'accent sur les perspectives de recherche qui apparaissent dans la continuité directe des contributions présentées dans ce manuscrit. Les travaux réalisés ont abordé les problématiques de l'analyse d'images de cellules uniques où l'automatisation de cette analyse est coûteuse et limitée par plusieurs facteurs :

- la préparation des échantillons,
- le choix de configurations microfluidiques,
- le choix de la technique d'imagerie microscopique,
- le pipeline de traitement d'images adapté.

Dans une première partie de la thèse, nous avons proposé principalement de baser les études sur la simulation numérique. Avec cette méthodologie, les paramètres biologiques et les paramètres optiques ont été utilisés pour générer des images de cellules uniques imitant plusieurs états cellulaires tels que des cellules saines et ou des cellules issues de tissus cancéreux, par la modification de l'organisation spatiale des marqueurs fluorescents, et aussi pour modéliser plusieurs techniques de microscopie, sous- et super-résolues, ainsi que l'environnement microfluidique. Différentes études ont mis en évidence l'importance de la simulation numérique pour résoudre les problématiques liées à l'automatisation de l'analyse de cellules uniques et au choix de la configuration optique. D'une part, la simulation numérique a été très utile pour l'instrumentation virtuelle, c'est-à-dire pour définir les meilleurs choix instrumentaux pour une tâche informatique spécifique. D'une autre part, la simulation a également été essentielle pour faire une augmentation des données fondée sur des bases physiques et biologiques pour l'entraînement d'algorithmes d'apprentissage profond et appliquées sur les images de données réelles.

Dans le chapitre 2 nous avons défini la qualité optimale de la PSF ainsi que l'algorithme de traitement d'images associé pour garantir une haute performance de tri en se basant sur la simulation numérique. Des ensembles d'espaces de descripteurs pointillistes et texturaux ont été testés incluant l'analyse des motifs spatiaux et l'analyse des distributions des distances, ainsi que la fonction d'autocorrélation, le GLCM et le

LBP. Cette étude a mis en évidence l'existence de configurations non-triviales où il n'est nul besoin de microscopes super-résolus coûteux pour détecter les changements dans l'organisation spatiale des marqueurs. À l'inverse, dans ces configurations, il est possible d'utiliser des microscopes sous-résolus (comme un microscope confocal) couplés à des espaces de caractéristiques texturales pour détecter efficacement ces changements.

Dans le chapitre 3, nous avons utilisé la simulation pour définir les paramètres de l'objectif, la dimension de l'image 2D ou 3D ou encore l'espace de caractéristiques texturales optimal, parmi le GLCM, le LBP et la transformée en scattering, qui permettent une bonne classification des cellules imagées en microscopie confocale. Cette étude a montré que la tranche 2D située au plan focal de l'objectif pouvait suffire à classer parfaitement les cellules saines des cellules cancéreuses lorsque la transformée en scattering est utilisée, réduisant ainsi le temps et la charge de calcul nécessaires à l'acquisition des volumes 3D. De plus, avec le même schéma de simulation, nous avons prouvé que l'imagerie diffractive de Fraunhofer pourrait être utilisée pour le tri cellulaire au lieu de l'imagerie conventionnelle lorsque la méthode de caractéristiques texturales et les paramètres optiques sont optimisés permettant ainsi une simplification de l'optique et du coût de la microscopie.

Dans le chapitre 4, nous avons poussé plus avant notre approche de simulation en intégrant les artefacts causés par la microfluidique. Nous avons utilisé dans l'étude de ce chapitre des images acquises avec un microscope à feuillet de lumière couplé un système microfluidique amenant automatiquement des cellules. Nous avons étudié cette situation moderne de cytométrie pour déterminer les vitesses maximales utilisables pour les cellules sans affecter la performance de tri. Les espaces des caractéristiques texturales 2D et 3D ont été également utilisés pour le tri des cellules. La simulation a montré que le flou causé par les vitesses typiques de cellules n'affecte quasiment pas la classification. Ces résultats ont été complétés avec des images réelles de cellules WT, XD et MD acquises à différentes vitesses (standard : 50 *nl/min* et rapide=140 *nl/min*). L'imagerie 2D et 3D ont été étudiées pour minimiser les coûts d'acquisition. Nous avons encore étudié la possibilité d'améliorer les performances en appliquant des algorithmes de débruitage basés sur l'apprentissage profond par réseaux de neurones convolutifs. La simulation dans ce chapitre a été utilisée non seulement pour l'instrumentation virtuelle, mais aussi pour l'augmentation des données. Les images synthétiques ont été utilisées pour entraîner les algorithmes de débruitage. Nous avons montré que cette étape de débruitage a permis d'améliorer la performance de tri et encore d'offrir plus de choix d'optimisation pour un tri des cellules à bas coût, rapide et à haut débit. Ce gain de performance par le débruitage est d'autant plus intéressant qu'il ne nécessite pas d'annotations manuelles puisque l'algorithme était entraîné sur des données synthétiques pour lesquelles la vérité terrain est parfaitement connue.

Dans une dernière partie de la thèse, nous avons réalisé un pas de côté en nous intéressant à un autre aspect de la cytologie moderne avec la possibilité d'analyse de cellules uniques au sein d'agrégats. Dans ce contexte, nous nous sommes concentrés sur une étude comparative entre différentes techniques de clarification appliquées à des sphéroïdes. Nous avons montré que les métriques locales usuelles pour sélectionner une méthode de clarification optimale ne sont pas fiables pour prédire les performances de segmentation des cellules. Nous avons aussi montré la puissance de l'apprentissage profond pour envisager de contourner l'étape de clarification et ouvrir la voie pour une détection et analyse de cellules dans les sphéroïdes à haut débit en réduisant le coût de la préparation des échantillons par apprentissage de transfert.

Perspectives

Des perspectives ont été détaillées à la fin de chacun des chapitres de la thèse. Nous en proposons quelques-unes supplémentaires qui vont advenir d'ici la fin du projet européen PROCHIP (2022) qui finançait cette thèse.

Le simulateur d'images développé a montré son succès pour définir les différentes configurations optiques et numériques, où les résultats théoriques obtenus par la simulation ont été validés et confirmés par des données réelles. Plusieurs améliorations pourraient être appliquées sur la simulation, notamment sur la partie biologique de la simulation. La simulation des chaînes de chromatines a été basée sur la modélisation d'un nombre réduit des chaînes (16 seulement) et l'organisation des marqueurs fluorescents a été faite d'une manière aléatoire sur les chaînes de chromatines ce qui représente une limitation de la simulation. Une amélioration visée est par l'amélioration de la simulation des chaînes de chromatine et la détermination des paramètres de distribution réelle des marqueurs dans les cellules saines et cancéreuses. Une manière de le faire est de s'appuyer sur les techniques Hi-C et les techniques d'imagerie de super résolution et/ou de méthodes bio-informatiques quantitatives d'analyse des distributions des marqueurs. Ces méthodes permettraient de trouver les modèles réelles des chaînes de chromatine et les caractéristiques des clusters, les densités des marqueurs, la distribution des marqueurs dans les clusters, etc. Ces paramètres pourraient être utilisés à l'entrée du simulateur pour ajouter plus de réalisme sur la simulation des cellules biologiques uniques. De plus, il serait intéressant d'ajouter au pipeline d'analyse plusieurs types des biomarqueurs et ainsi de simuler plusieurs canaux d'images sur une même cellule générée. Le tri de cellules a été mené avec le mcherry comme marqueur des histones H2B. D'autres investigations vont être réalisées dans le cadre du projet PROCHIP en testant plusieurs types de marquages. Finalement, la microscopie à feuillet de lumière a été couplée avec un système microfluidique. Il sera intéressant

de tester d'autres types de microscopies, comme le microscope à 3 faisceaux de nappe de lumière à illumination structurée spécialement développé dans le cadre du projet PROCHIP.

Contributions de l'auteur

Articles

Ahmad, A., Frindel, C., & Rousseau, D. (2020). Detecting differences of fluorescent markers distribution in single cell microscopy : textural or pointillist feature space? *Frontiers in Robotics and AI*, 7, 39. (c.f. chapitre 2)

Ahmad, A., Sala, F., Bassi, A., Bragheri, F., Frindel, C., & Rousseau, D. (2021). Toward efficient high-throughput cell sorting via microfluidics coupled to fluorescent microscopy and machine learning. Soumis à *IEEE Access*. (c.f. chapitre 4)

Ahmad, A., Goodarzi, S., Frindel, C., Recher, G., Riviere, C., & Rousseau, D. (2021). Clearing spheroids for 3D fluorescent microscopy : combining safe and soft chemicals with deep convolutional neural network. Soumis à *Plos One*. (c.f. chapitre 5)

Outil informatique

Ahmad, A., Vanel, G., Frindel, C., & Rousseau, D. (2021). MicroVIP : a microscopy image simulation and analysis tool on Virtual Imaging Platform. Soumis à *SoftwareX Elsevier*. (c.f. annexe C)

Conférences internationales

Ahmad, A., Vanel, G., Frindel, C., & Rousseau, D. (2021, March). Influence of Motion-Blur in Single Cell Image Analysis via Microfluidic Microscopy. In *24th Conference Focus on Microscopy (FOM 2021)*.

Ahmad, A., Vanel, G., Frindel, C., & Rousseau, D. (2021, April). Assessing diffractive imaging for cytometry of cells. In *18th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2021)*. (c.f. chapitre 3)

Ahmad, A., Frindel, C., & Rousseau, D. (2020, November). Sorting cells from fluorescent markers organization in confocal microscopy : 3D versus 2D images. In *2020 Tenth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA)* (pp. 1-6). IEEE. (c.f. chapitre 3)

Ahmad, A., Frindel, C., Rasti, P., Sarrut, D., & Rousseau, D. (2019, January). Deep learning-based detection of cells in 3D light sheet fluorescence microscopy. In *Quantitative BioImaging Conference (QBI 2019)*.

Conférence nationale

Ahmad, A., Frindel, C., & Rousseau, D. (2019, August). Détection de différence de densité de marqueurs fluorescents en microscopie superrésolue : approche pointilliste ou texturale?. In *XXVIIe colloque Gretsi*. (c.f. chapitre 2)

Journée scientifique et workshop (présentation orale)

Ahmad, A., & Rousseau, D. (2020, January). Machine learning tutorial with applications in bioimaging. In *Machine learning/ Deep learning for biology*, Paris, France.

Ahmad, A., Frindel, C., & Rousseau, D. (2020, April). Adapting machine learning feature spaces with fluorescence microscopy resolution for single cells classification. In *Aurox Conference on Microscopy*.

Ahmad, A., Frindel, C., & Rousseau, D. (2021, March). Vers une clarification numérique en imagerie des sphéroïdes. In *Journée Imagerie Optique Non conventionnelle – 16-ème édition (JIONC 2021)*.

Les descripteurs d'Haralick

A partir d'une matrice de cooccurrence d'Haralick P de taille n^2 , nous pouvons calculer les caractéristiques suivantes qui sont le plus classiquement utilisées :

1. Sum average :

$$\sum_{i=1}^{2n} iP_{x+y}(i) \quad (\text{A.1})$$

2. Sum variance :

$$\sum_{i=1}^{2n} (i - \mu_{x+y})^2 P_{x+y}(i) \quad (\text{A.2})$$

3. Contrast :

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (i - j)^2 P(i, j) \quad (\text{A.3})$$

4. Correlation :

$$\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n ijP(i, j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y} \quad (\text{A.4})$$

5. Entropy :

$$-\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P(i, j) \log(P(i, j)) \quad (\text{A.5})$$

6. Energy :

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P(i, j)^2 \quad (\text{A.6})$$

7. Dissimilarity :

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n |i-j|P(i,j) \quad (\text{A.7})$$

8. Difference entropy :

$$-\sum_{i=0}^{n-1} P_{x-y}(i) \log(P_{x-y}(i)) \quad (\text{A.8})$$

9. Difference variance :

$$\sum_{i=0}^{n-1} (i - \mu_{x-y})^2 P_{x-y}(i) \quad (\text{A.9})$$

10. Information measure of correlation 1 :

$$\frac{HXY - HXY1}{\max(HX, HY)} \quad (\text{A.10})$$

11. Information measure of correlation 2 :

$$\sqrt{1 - \exp[-2(HXY2 - HXY)]} \quad (\text{A.11})$$

12. Inverse difference :

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{P(i,j)}{1 + |i-j|} \quad (\text{A.12})$$

13. Sum entropy :

$$-\sum_{i=2}^{2n} P_{x+y}(i) \log(P_{x+y}(i)) \quad (\text{A.13})$$

14. Sum variance :

$$-\sum_{i=2}^{2n} (i - \mu_{x+y})^2 P_{x+y}(i) \quad (\text{A.14})$$

Pour pouvoir calculer les caractéristiques précédentes, il est nécessaire de définir les statistiques suivantes :

$$HX = -\sum_{i=1}^n P_x(i) \log(P_x(i))$$

$$HY = -\sum_{i=1}^n P_y(i) \log(P_y(i))$$

$$HXY = -\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P(i,j) \log(P(i,j))$$

$$HXY1 = - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P_x(i,j) \log(P_x(i)P_y(j))$$

$$HXY2 = - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P_x(i)P_y(j) \log(P_x(i)P_y(j))$$

$$P_x(i) = \sum_{j=1}^n P(i,j)$$

$$P_y(j) = \sum_{i=1}^n P(i,j)$$

$$P_{x+y}(i) = \sum_{i+j=q} P(i,j), q = 2, 3, 2k$$

$$P_{|x-y|}(i) = \sum_{i+j=q} P(i,j), q = 2, 3, k-1$$

$$\mu_x = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n iP(i,j)$$

$$\mu_y = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n jP(i,j)$$

Optimisation des classifieurs

Cette annexe contient les différentes informations complémentaire pour le travail présenté dans le chapitre 2. Il détaille les différentes opérations d'optimisation réalisées pour le choix de classifieur et des hyper-paramètres des méthodes d'extractions des caractéristiques texturales LBP et GLCM.

B.1 Sélection du meilleur classifieur

Dans l'étude présentée dans le chapitre 2, le Support Vector Machine (SVM) a été utilisée comme classifieur pour la comparaison des espaces de caractéristiques texturales ou pointillistes. Plusieurs autres types des classifieurs ont également été testés, notamment l'arbre de décision, la régression logistique et les K-voisins les plus proches (KNN) [236]. Les performances de classification pour chacun de ces classifieurs couplés à des espaces de caractéristiques texturales et pointillistes ont été calculées pour des données synthétiques pour toutes les tailles de PSF et pour des images de données réelles. Les tableaux B.1, B.2, B.3, B.4 et B.5 présentent les performances de la classification entre (C_1, C_2) basée sur les différences de densité respectivement pour les espaces de caractéristiques auto-corrélation, GLCM, LBP, analyse de la distribution des distance et fonction \hat{K} de Ripley. De plus, le tableau B.6 montre les performances de classification entre deux classes de cellules réelles (saines et malsaines) en utilisant les quatre classifieurs basés sur les mêmes espaces de caractéristiques texturales ou pointillistes. Sur les données synthétiques, aucun écart systématique significatif de performance n'a été trouvé entre les quatre classifieurs lorsqu'ils ont été examinés sur une large gamme de tailles de PSF. Sur les données réelles, le classifieur SVM avec un noyau linéaire a fourni les meilleures performances de classification. C'est pourquoi il a été sélectionné pour la comparaison des espaces de caractéristiques dans l'étude du chapitre 2.

B.2 Optimisation des hyper-paramètres pour GLCM et LBP

Deux paramètres principaux doivent être optimisés pour obtenir les meilleures performances de classification pour les méthodes texturales GLCM [151] et LBP [154].

TABLEAU B.1 – Performance de la classification (en pourcentage %) pour la discrimination entre les populations de cellules (C_1, C_2) basée sur les différences de densité en fonction de la résolution de l'image (taille du PSF, rapport k). Espace de caractéristiques texturales par auto-corrélation couplé à quatre classifieurs. Le meilleur classifieur pour chaque valeur du rapport k de l'équation (2.1) est mentionné en gras.

Classifieurs	Performance de classification (%) en fonction du rapport k										
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.9	1.3	1.5	1.8	2
<i>Arbre de décision</i>	93.8	91.2	93	91	91.2	89.8	87.8	87	86	88.4	89.6
<i>Régression logistique</i>	94.4	92.6	93.8	92.2	94	92.4	90.4	89.2	89.6	89.2	90
<i>SVM</i>	94.4	93	93.2	92.6	92.8	91.2	88.8	89.8	90.4	88.4	90.2
<i>KNN</i>	94	91	92.2	91.6	91.8	91.4	89.4	87.8	87.4	88	89.4

TABLEAU B.2 – Même que le tableau B.1 mais avec l'espace de caractéristiques texturales GLCM.

Classifieurs	Performance de classification (%) en fonction du rapport k										
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.9	1.3	1.5	1.8	2
<i>Arbre de décision</i>	67.2	73	82	85.8	83.8	86.6	92	89.8	89.8	91.8	94.6
<i>Régression logistique</i>	72.4	84.6	87.4	88.2	88.6	89.2	92.8	92.2	89.8	91.4	94
<i>SVM</i>	72.2	84.6	87.8	88	88.6	88.4	92.2	91.6	90.2	91	94.2
<i>KNN</i>	68.6	81.8	85.8	86.4	85.6	87.2	90	89.6	91.4	89.8	93.2

TABLEAU B.3 – Même que le tableau B.1 mais avec l'espace de caractéristiques texturales LBP.

Classifieurs	Performance de classification (%) en fonction du rapport k										
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.9	1.3	1.5	1.8	2
<i>Arbre de décision</i>	76.4	72	60.6	63.2	77.8	89.6	92.4	89.2	91.2	90.4	93
<i>Régression logistique</i>	78.6	78.4	63.4	67.8	81.2	91.6	92.4	91.8	92.8	92.2	93.4
<i>SVM</i>	78.4	79	64.2	67.8	81	91.8	92.4	91.2	92.4	92.2	93.8
<i>KNN</i>	77.2	77.8	56.4	62.4	79.2	90.4	90.4	88.4	90.8	91.2	92

Ces paramètres sont la taille du voisinage pour le GLCM et la taille de la fenêtre dans laquelle les images sont divisées lors du calcul des caractéristiques LBP. Pour l'optimisation, les performances de classification basées sur les méthodes texturales GLCM et LBP ont été calculées pour les 11 σ_{psf} également utilisés dans les tableaux B.1 à B.5 allant de sous-résolu à super-résolu. Un classificateur SVM linéaire a été utilisé comme classifieur et les espaces de caractéristiques de LBP et GLCM ont été réduits à 5 en utilisant l'analyse en composantes principales. Les performances obtenues pour toutes les tailles de PSF ont été moyennées. La taille du voisinage et la taille de la fenêtre qui ont donné les meilleurs résultats de classification se sont avérées optimales à 72×72 (voir figure B.1).

TABLEAU B.4 – Même que le tableau B.1 mais avec l'espace de caractéristiques pointillistes de distribution de la distance.

Classifieurs	Performance de classification (%) en fonction du rapport k										
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.9	1.3	1.5	1.8	2
<i>Arbre de décision</i>	67	58	61.4	54.6	65.2	57	62.6	81.6	84.6	90.6	85
<i>Régression logistique</i>	69.6	62.2	57	59.8	77.2	66	65.6	87.2	84.8	93.4	91.2
SVM	70.2	62.6	57.2	59	76.6	64.8	62.8	86.2	84.8	92.2	89.8
KNN	63.4	63.6	55.8	56.2	71.2	58	57.8	83.2	82.2	89.6	88.8

TABLEAU B.5 – Même que le tableau B.1 mais avec l'espace de caractéristiques pointillistes de la fonction \hat{K} de Ripley.

Classifieurs	Performance de classification (%) en fonction du rapport k										
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.9	1.3	1.5	1.8	2
<i>Arbre de décision</i>	56.4	52.4	55.4	49.2	49	48.4	56.4	64.6	67.8	68.2	64.4
<i>Régression logistique</i>	59.2	53.8	56.4	48.2	46.4	50.2	55.2	68	65.4	71.8	65
SVM	59	53.2	56.6	50.6	48.6	48	59.4	67.2	65	71.8	65.6
KNN	54.6	55.2	50	47.8	53.6	49.6	55.8	64.4	65.2	67	62

TABLEAU B.6 – Résultats de la classification (en pourcentage %) entre les populations des cellules réelles saines et malsaines. Quatre classifieurs sont utilisés pour étudier les espaces de caractéristiques texturales et pointillistes. Le meilleur classificateur pour chaque espace de caractéristiques est mentionné en gras.

Espaces des caractéristiques	Classifieurs			
	<i>Arbre de décision</i>	<i>Régression logistique</i>	SVM	KNN
<i>Auto correlation</i>	94.4	94.6	94.7	94.7
GLCM	62.7	68.7	70	67.3
LBP	65.8	64	64	62
<i>Distribution de la distance</i>	71.8	74.4	78.8	79.8
<i>Fonction \hat{K} de Ripley</i>	67.6	67.7	69	66.6

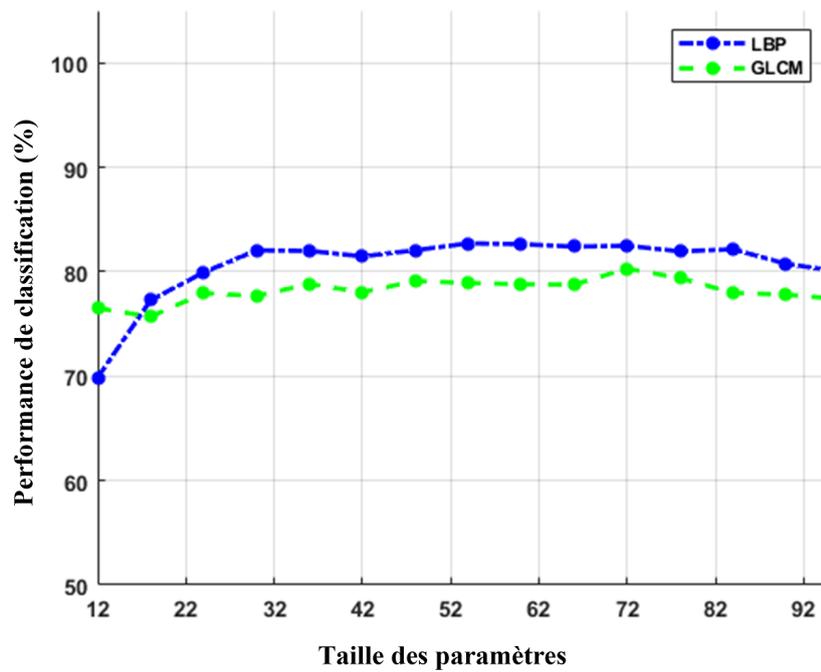


FIGURE B.1 – Performances de classification moyennées pour tous les σ_{psf} en fonction de la taille du voisinage et de la taille de la fenêtre pour le GLCM et le LBP respectivement.

MicroVIP : outil de simulation et d'analyse d'images de microscopie à fluorescence sur la plate-forme VIP

Les études réalisées durant la thèse ont mené au développement d'un outil de simulation et d'analyse d'images de microscopie à fluorescence : MicroVIP. Dans cette annexe, nous décrivons cet outil et nous détaillons ces différentes fonctionnalités.

C.1 Qu'est ce que MicroVIP ?

MicroVIP est un outil convivial de simulation et d'analyse d'images de microscopie à fluorescence déployé sur la plateforme d'imagerie virtuelle (VIP, *pour Virtual Imaging Platform*) [237] du laboratoire CREATIS de l'Université de Lyon. MicroVIP intègre une modélisation de la vérité terrain sous forme d'un nuage de points 3D de positions des fluorophores, une simulation du processus d'acquisition de l'image microscopique 3D ainsi qu'une application de méthodes conventionnelles d'extraction de features 2D et 3D. Il offre la possibilité de simuler de façon centralisée, i.e. avec une interface unifiée, diverses techniques de microscopie à fluorescence, telles que la microscopie à champ large (WFM), la microscopie confocale (CFM), la microscopie à illumination structurée (SIM), la microscopie à feuillet de lumière (LSFM) et la microscopie à super résolution (SMLM). Ainsi, il permet de simuler l'imagerie des échantillons en mouvement comme on en trouve dans les systèmes microfluidiques.

C.2 Motivation et signification

La simulation d'images de microscopie permet de définir et de réaliser virtuellement des expériences de microscopie. Elle peut être utilisée pour évaluer l'effet de plusieurs paramètres physiques sur les images de microscopie avant de réaliser une expérience réelle. De plus, elle permet de générer un grand nombre d'images, ainsi que leur annotation (vérité terrain), pour un coût extrêmement faible, ce qui en fait un outil précieux pour entraîner ou tester des algorithmes d'analyse d'images basée sur l'apprentissage automatique et valider leur comportement face à plusieurs conditions expérimentales

(images sous-résolues ou super-résolues, phénotypes cellulaires variables...). De nombreux simulateurs de microscopie à fluorescence ont été proposés dans la littérature. Nous citons par exemple les simulateurs des images confocales ConfocalGN [238] et PSFLab [239], l'outil de simulation de la super-résolution SOFI [240], l'outil de simulation de LSFM Biobeam [241], etc. Cependant, ces outils sont généralement spécifiques à une seule technique de microscopie, ils manquent également de standardisation, et ne partagent donc pas d'ensembles communs d'entrées ou de sorties, de langages de programmation communs, de plates-formes ou de types d'interface. Il est donc difficile de trouver le logiciel dont on a besoin en fonction de son expertise, des contraintes matérielles, des conditions expérimentales, etc.

Avec MicroVIP, nous proposons une seule application conviviale regroupant des simulateurs pour un large éventail de techniques de microscopie. En plus d'offrir une interface graphique très facile à comprendre, MicroVIP est doté de capacités complètes de personnalisation des paramètres pour une flexibilité et une adaptation aux besoins de l'expérimentateur.

C.3 Description du logiciel

Dans cette section, nous présentons l'architecture, les fonctionnalités et des exemples illustratifs produits au moyen de MicroVIP.

C.3.1 Architecture de MicroVIP

MicroVIP consiste en trois modules principaux. Chacun de ces modules est décrit ci-dessous, ainsi qu'un pipeline global de MicroVIP montrant les trois modules, les entrées et les sorties est montré dans la figure C.1.

C.3.1.1 Module 1 : Génération des objets biologiques

Ce module est utilisé pour la modélisation des chaînes de chromatines 3D et la génération des marqueurs fluorescents sur les chaînes (voir section 3.2.1 du chapitre 3). Les chaînes des chromatines et ses différentes configurations ont été modélisés et inclus dans l'outil MicroVIP. Ce module prend à son entrée les paramètres de distribution aléatoire uniforme ou gaussienne des marqueurs fluorescents. Il renvoie à sa sortie une liste des coordonnées du nuage de points 3D qui sera utilisé à l'entrée du module 2.

C.3.1.2 Module 2 : Simulation de la microscopie

C'est l'endroit où l'image microscopique sera simulée. Ce module prend à l'entrée le nuage de points 3D et en plus les paramètres optiques du microscope, tel que, le type de microscope, les paramètres de l'objectif (NA , magnification et immersion), la longueur d'onde du laser (λ), les dimensions latérales de l'image de sortie (en pixels), la taille d'un pixel de la caméra (en μm), les pas de sectionnement axiale (en direction z), la largeur de la nappe de lumière en cas du LSFM et la vitesse des cellules pour une simulation de la microfluidique. Il renvoie à sa sortie l'image 3D synthétique, l'image de vérité terrain correspondante et la PSF 3D générée.

C.3.1.3 Module 3 : Extraction des caractéristiques

C'est le module responsable de l'extraction des caractéristiques texturales et pointillistes des images décrites dans la section 1.7.5 du chapitre 1. Il prend à son entrée l'image synthétique 3D et renvoie à sa sortie un vecteur des caractéristiques. Ce module intègre aussi l'outil UNLOC utilisé pour localiser individuellement des marqueurs fluorescents (décrit dans la section 2.4 du chapitre 2) pour l'extraction des caractéristiques pointillistes de la distribution des marqueurs.

Plus de détails sur le code MATLAB, les paramètres d'entrées et les sorties sont décrits dans la page web suivante : <https://gitlab.in2p3.fr/guillaume.vanel/microvip/-/wikis/home>.

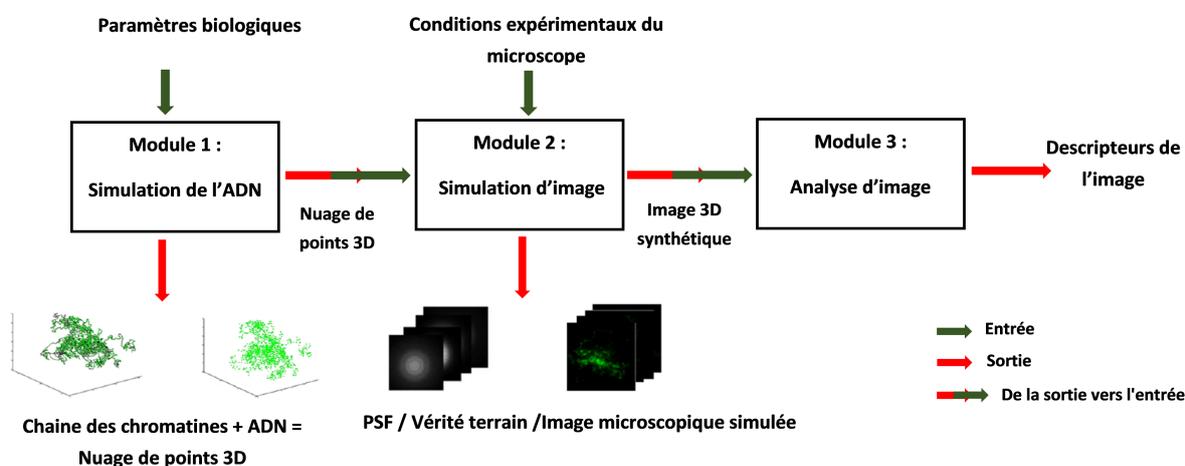


FIGURE C.1 – Schéma globale de l'outil de simulation et d'analyse des images microscopie MicroVIP. Il consiste en trois modules principaux, tels que le premier pour la simulation des objets biologiques (l'ADN), le deuxième pour la simulation des images microscopiques et le troisième pour l'extraction des caractéristiques de l'image simulée.

C.3.2 Exemples illustratifs

Un exemple d'images simulées à la sortie du deuxième module de MicroVIP est illustré dans la figures C.2. Les images sont simulées pour trois différentes modalités de microscopie sont : champ large (WFM), confocale (CFM) et microscopie à illumination structurée (SIM) à deux faisceaux laser avec trois décalages de phases. Les paramètres de l'objectif utilisés dans la simulation sont 40x, immersion de l'eau ($n = 1.33$) $NA = 0.95$. La longueur d'onde d'excitation est de $\lambda = 561 \text{ nm}$ et une dimension latérale des images de 256×256 pixels avec une taille de pixel de la caméra de $6.5 \mu\text{m}$ et un pas en direction axiale $dz = 0.4 \mu\text{m}$. Seulement deux chaînes de chromatines ont été utilisées à l'entrée du module 1 et les marqueurs fluorescents sont générés par une distribution uniforme $\sim U(0, 40)$.

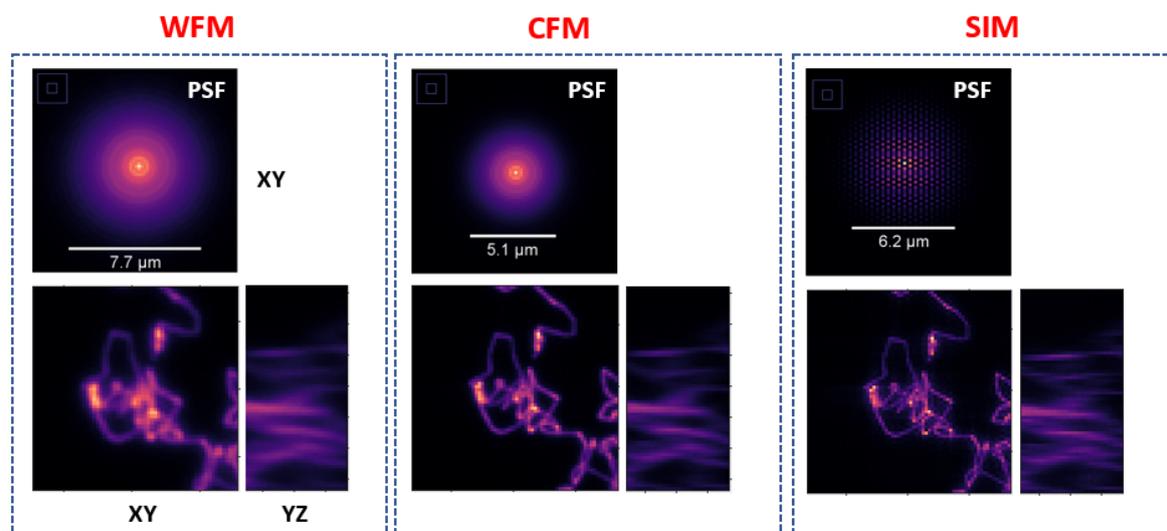


FIGURE C.2 – Exemples d’images microscopiques et de PSFs simulées avec différentes modalités de microscopie avec MicroVIP. Les modalités sont le champ large (WFM), confocale (CFM) et illumination structurée (SIM) à deux faisceaux laser.

C.4 Impact du logiciel MicroVIP

L’analyse d’images de microscopie à cellule unique est primordiale pour la biologie quantitative moderne. Ceci a encouragé la création de MicroVIP, l’outil de simulation et d’analyse d’images de microscopie, qui regroupe les techniques de microscopie à fluorescence les plus avancées et les plus utilisées en une seule plateforme.

L’outil proposé permet de simuler différentes techniques de microscopie pour une même cellule incluant aussi l’imagerie de cellules en mouvement dans un système microfluidique, avec une vitesse cellulaire personnalisée. De plus, MicroVIP implémente un pipeline de simulation complet et autonome plutôt que de modéliser uniquement le processus d’acquisition d’images. Il intègre en effet un module de génération de la vérité terrain des chaînes de chromatine cellulaire et des positions des marqueurs fluorescents, ainsi qu’un autre réalisant les méthodes d’extraction de caractéristiques communément utilisées après l’obtention de l’image simulée. Par conséquent, cette conception permet à l’expérimentateur de faire de l’instrumentation virtuelle en réalisant des tests *in silico* à bas coûts et rapides pour déterminer les meilleurs paramètres optiques et physiques avant une expérience réelle de microscopie. Et aussi elle permet de faire de l’augmentation de données par la réalisation rapide et peu coûteuse d’une base de données d’images microscopiques 3D et sa vérité terrain associée, pour la calibration ou l’entraînement d’outils d’analyse d’image et/ou de classification d’images de cellules.

Enfin, son déploiement sur la plateforme d’imagerie virtuelle (VIP) de laboratoire CREATIS permet à l’utilisateur d’exécuter le logiciel sans se soucier des procédures d’installation, des dépendances ou des contraintes matérielles. Ainsi, la plateforme VIP offre des capacités de parallélisation, permettant de générer un grand nombre d’images simulées en exécutant de manière transparente des exécutions parallèles sur

l'infrastructure de la grille européenne (EGI, pour *European Grid Infrastructure*) ce qui permet une simulation d'un grand nombre des cellules et ses vérités terrains nécessaires pour l'apprentissage profond rapidement. Une illustration de la moyenne et l'écart type du temps de calcul (en heures) nécessaire pour la simulation et l'extraction des caractéristiques des cellules acquises avec un LSFM dans un système microfluidique en fonction du nombre de cellules simulées avec et sans la parallélisation de calcul est présentée dans la figure C.3. La parallélisation de calcul offerte par l'EGI montre un gain du temps d'environ 35 fois pour la simulation d'images en comparaison avec la simulation sans parallélisation.

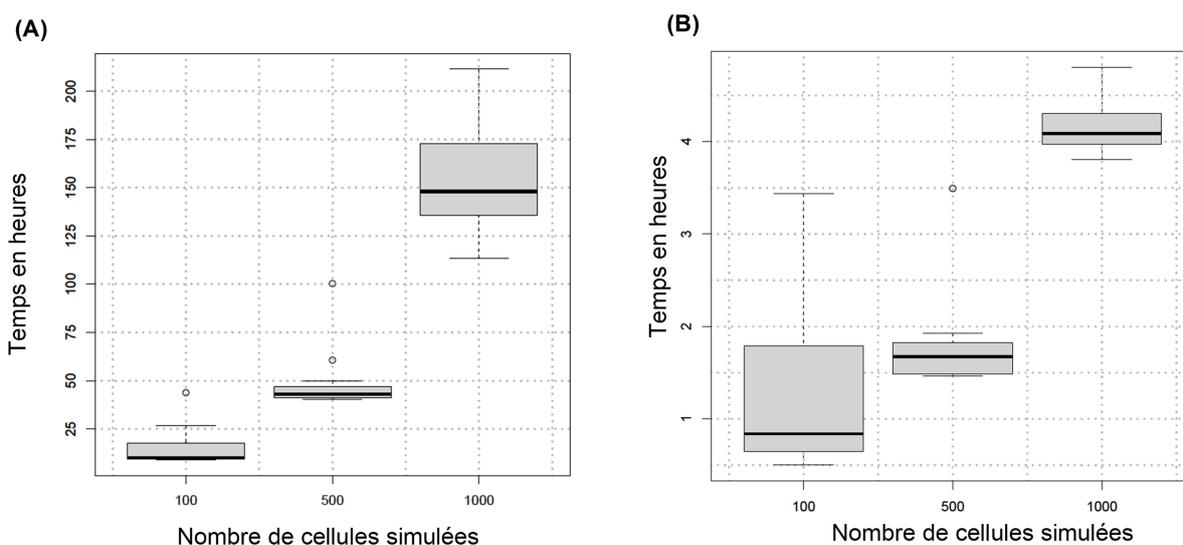


FIGURE C.3 – Moyennes et écarts type du temps de simulation avec MicroVIP en fonction du nombre de cellules : (A) sans la parallélisation et (B) avec la parallélisation de calcul offerte par l'EGI.

C.5 Conclusion

Dans cette annexe, nous avons présenté MicroVIP, l'outil de simulation et d'analyse des images de microscopie à fluorescence qui a été développé durant la thèse. Cet outil est accessible publiquement sur la plateforme d'imagerie virtuelle (VIP) par le lien suivant : (<http://vip.creatis.insa-lyon.fr/>). Ainsi, une page de l'outil MicroVIP a été créée et elle est accessible par le lien suivant : <https://www.creatis.insa-lyon.fr/site7/en/MicroVIP>.

Bibliographie

- [1] Michail SHIPITSIN, Lauren L CAMPBELL, Pedram ARGANI, Stanisława WEREMOWICZ, Noga BLOUSHTAIN-QIMRON, Jun YAO, Tatiana NIKOLSKAYA, Tatiana SEREBRYISKAYA, Rameen BEROUKHIM, Min HU et al. « Molecular definition of breast tumor heterogeneity ». In : *Cancer cell* 11.3 (2007), p. 259-273.
- [2] Karel KLEPÁRNÍK et František FORET. « Recent advances in the development of single cell analysis—A review ». In : *Analytica chimica acta* 800 (2013), p. 12-21.
- [3] Nicholas C TURNER et Jorge S REIS-FILHO. « Genetic heterogeneity and cancer drug resistance ». In : *The lancet oncology* 13.4 (2012), e178-e185.
- [4] Celine Liu BAUWENS, Raheem PEERANI, Sylvia NIEBRUEGGE, Kimberly A WOODHOUSE, Eugenia KUMACHEVA, Mansoor HUSAIN et Peter W ZANDSTRA. « Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories ». In : *Stem cells* 26.9 (2008), p. 2300-2310.
- [5] Hideharu MIKAMI, Cheng LEI, Nao NITTA, Takeaki SUGIMURA, Takuro ITO, Yasuyuki OZEKI et Keisuke GODA. « High-speed imaging meets single-cell analysis ». In : *Chem* 4.10 (2018), p. 2278-2300.
- [6] Tao LUO, Lei FAN, Rong ZHU et Dong SUN. « Microfluidic single-cell manipulation and analysis : methods and applications ». In : *Micromachines* 10.2 (2019), p. 104.
- [7] C Wyatt SHIELDS IV, Catherine D REYES et Gabriel P LÓPEZ. « Microfluidic cell sorting : a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation ». In : *Lab on a Chip* 15.5 (2015), p. 1230-1249.
- [8] Ruey-Jen YANG, Lung-Ming FU et Hui-Hsiung HOU. « Review and perspectives on microfluidic flow cytometers ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 266 (2018), p. 26-45.
- [9] Khashayar MOSHKAYAN, Navid KASHANINEJAD, Majid Ebrahimi WARKIANI, John G LOCK, Hajar MOGHADAS, Bahar FIROOZABADI, Mohammad Said SAIDI et Nam-Trung NGUYEN. « Spheroids-on-a-chip : Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 263 (2018), p. 151-176.
- [10] Li YING et Qi WANG. « Microfluidic chip-based technologies : emerging platforms for cancer diagnosis ». In : *BMC biotechnology* 13.1 (2013), p. 1-10.
- [11] Yigang SHEN, Yaxiaer YALIKUN et Yo TANAKA. « Recent advances in microfluidic cell sorting systems ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 282 (2019), p. 268-281.

- [12] Véronique LECAULT, Adam K WHITE, Anupam SINGHAL et Carl L HANSEN. « Microfluidic single cell analysis : from promise to practice ». In : *Current opinion in chemical biology* 16.3-4 (2012), p. 381-390.
- [13] Q KOU, I YESILYURT, V STUDER, M BELOTTI, E CAMBRIL et Y CHEN. « On-chip optical components and microfluidic systems ». In : *Microelectronic engineering* 73 (2004), p. 876-880.
- [14] Jessamine MK NG, Irina GITLIN, Abraham D STROOCK et George M WHITESIDES. « Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems ». In : *Electrophoresis* 23.20 (2002), p. 3461-3473.
- [15] Soon-Eng ONG, Sam ZHANG, Hejun DU et Yongqing FU. « Fundamental principles and applications of microfluidic systems ». In : *Front. Biosci* 13.1 (2008), p. 2757-2773.
- [16] Rustem F ISMAGILOV. « Integrated microfluidic systems ». In : *Angewandte Chemie International Edition* 42.35 (2003), p. 4130-4132.
- [17] Dan GAO, Feng JIN, Min ZHOU et Yuyang JIANG. « Recent advances in single cell manipulation and biochemical analysis on microfluidics ». In : *Analyst* 144.3 (2019), p. 766-781.
- [18] Pallavi SHINDE, Loganathan MOHAN, Amogh KUMAR, Koyel DEY, Anjali MADDI, Alexander N PATANANAN, Fan-Gang TSENG, Hwan-You CHANG, Moeto NAGAI et Tuhin Subhra SANTRA. « Current trends of microfluidic single-cell technologies ». In : *International journal of molecular sciences* 19.10 (2018), p. 3143.
- [19] Jose L GARCIA-CORDERO et Sebastian J MAERKL. « Microfluidic systems for cancer diagnostics ». In : *Current opinion in biotechnology* 65 (2020), p. 37-44.
- [20] Jie WANG, Peng MA, Daniel H KIM, Bi-Feng LIU et Utkan DEMIRCI. « Towards microfluidic-based exosome isolation and detection for tumor therapy ». In : *Nano Today* 37 (2021), p. 101066.
- [21] Ivar MEYVANTSSON et David J BEEBE. « Cell culture models in microfluidic systems ». In : *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1 (2008), p. 423-449.
- [22] Ju Hun YEON et Je-Kyun PARK. « Microfluidic cell culture systems for cellular analysis ». In : *Biochip J* 1.1 (2007), p. 17-27.
- [23] K KWAPISZEWSKA, A MICHALCZUK, M RYBKA, R KWAPISZEWSKI et Z BRZÓZKA. « A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening ». In : *Lab on a Chip* 14.12 (2014), p. 2096-2104.
- [24] Eric W ESCH, Anthony BAHINSKI et Dongeun HUH. « Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery ». In : *Nature reviews Drug discovery* 14.4 (2015), p. 248-260.
- [25] Jing WU, Ziyi HE, Qiushui CHEN et Jin-Ming LIN. « Biochemical analysis on microfluidic chips ». In : *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016), p. 213-231.
- [26] Bo BAO, Zhichao WANG, Dilantha THUSHARA, Achini LIYANAGE, Sanja GUNAWARDENA, Zaiyong YANG et Shuangliang ZHAO. « Recent Advances in Microfluidics-Based Chromatography—A Mini Review ». In : *Separations* 8.1 (2021), p. 3.

- [27] Roxane ELALDI, Patrice HEMON, Luciana PETTI, Estelle COSSON, Belinda DESRUES, Anne SUDAKA, Gilles POISSONNET, Van OBBERGHEN-SCHILLING, Jacques-Olivier PERS, Veronique M BRAUD et al. « High Dimensional Imaging Mass Cytometry Panel to Visualize the Tumor Immune Microenvironment Contexture ». In : *Frontiers in Immunology* 12 (2021), p. 1254.
- [28] Walid E KHALBUSS, Liron PANTANOWITZ et Anil V PARWANI. « Digital imaging in cytopathology ». In : *Pathology research international* 2011 (2011).
- [29] Federico SALA, Michele CASTRIOTTA, Petra PAIÈ, Andrea FARINA, Sarah D'ANNUNZIO, Alessio ZIPPO, Roberto OSELLAME, Francesca BRAGHERI et Andrea BASSI. « High-throughput 3D imaging of single cells with light-sheet fluorescence microscopy on chip ». In : *Biomedical optics express* 11.8 (2020), p. 4397-4407.
- [30] G GOPAKUMAR, K Hari BABU, Deepak MISHRA, Sai Siva GORTHI et Gorthi RK Sai SUBRAHMANYAM. « Cytopathological image analysis using deep-learning networks in microfluidic microscopy ». In : *JOSA A* 34.1 (2017), p. 111-121.
- [31] Stavros STAVRAKIS, Gregor HOLZNER, Jaebum CHOO et Andrew DEMELLO. « High-throughput microfluidic imaging flow cytometry ». In : *Current opinion in biotechnology* 55 (2019), p. 36-43.
- [32] SS RYABICHKO, AN IBRAGIMOV, LA LEBEDEVA, EN KOZLOV et YV SHIDLOVSKII. « Super-Resolution Microscopy in Studying the Structure and Function of the Cell Nucleus ». In : *Acta Naturae* 9.4 (34) (2017), p. 42 -51.
- [33] Michael J SANDERSON, Ian SMITH, Ian PARKER et Martin D BOOTMAN. « Fluorescence microscopy ». In : *Cold Spring Harbor Protocols* 2014.10 (2014), p. pdb-top071795.
- [34] Jeff W LICHTMAN et José-Angel CONCHELLO. « Fluorescence microscopy ». In : *Nature methods* 2.12 (2005), p. 910-919.
- [35] U KUBITSCHCK. *Fluorescence microscopy : from principles to biological applications*. 2017.
- [36] Adaobi NWANESHIUDU, Christiane KUSCHAL, Fernanda H SAKAMOTO, R ROX ANDERSON, Kathryn SCHWARZENBERGER et Roger C YOUNG. « Introduction to confocal microscopy ». In : *Journal of Investigative Dermatology* 132.12 (2012), p. 1-5.
- [37] Ernst HK STELZER. « Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology ». In : *Nature Methods* 12.1 (2015), p. 23 -26.
- [38] Jan HUISKEN, Jim SWOGER, Filippo DEL BENE, Joachim WITTBRODT et Ernst HK STELZER. « Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy ». In : *Science* 305.5686 (2004), p. 1007-1009.
- [39] Manish SAXENA, Gangadhar ELURU et Sai Siva GORTHI. « Structured illumination microscopy ». In : *Advances in Optics and Photonics* 7.2 (2015), p. 241-275.
- [40] Christophe CREMER, Aleksander SZCZUREK, Florian SCHOCK et al. « Super-resolution microscopy approaches to nuclear nanostructure imaging ». In : *Methods* 123 (2017), p. 11-32.

- [41] Melike LAKADAMYALI et Maria Pia COSMA. « Advanced microscopy methods for visualizing chromatin structure ». In : *FEBS letters* 589.20PartA (2015), p. 3023-3030.
- [42] Lothar SCHERMELLEH, Heintzmann RAINER et Heinrich LEONHARDT. « A guide to super-resolution fluorescence microscopy ». In : *The Journal of cell biology* 190.2 (2010), p. 165-175.
- [43] Barry R MASTERS. « Fluorescence microscopy : from principles to biological applications ». In : *journal of Biomedical Optics* 19.4 (2014), p. 049901.
- [44] Christoph CREMER et Udo BIRK. « Perspectives in super-resolved fluorescence microscopy : What comes next ? » In : *Frontiers in Physics* 4 (2016), p. 11.
- [45] Shannon J L PINNINGTON, John F MARSHALL et Ann P WHEELER. « Correlative 3D structured illumination microscopy and single-molecule localization microscopy for imaging cancer invasion ». In : *Protein Complex Assembly*. Springer, 2018, p. 253-265.
- [46] Petra PAIÈ, Rebeca MARTÍNEZ VÁZQUEZ, Roberto OSELLAME, Francesca BRAGHERI et Andrea BASSI. « Microfluidic based optical microscopes on chip ». In : *Cytometry Part A* 93.10 (2018), p. 987-996.
- [47] Yu-Jui FAN, Han-Yun HSIEH, Sheng-Fang TSAI, Cheng-Hsuan WU, Chia-Ming LEE, Yen-Ting LIU, Chieh-Han LU, Shu-Wei CHANG et Bi-Chang CHEN. « Microfluidic channel integrated with a lattice lightsheet microscopic system for continuous cell imaging ». In : *Lab on a Chip* 21.2 (2021), p. 344-354.
- [48] Muhsincan SESEN et Graeme WHYTE. « Image-based single cell sorting automation in droplet microfluidics ». In : *Scientific Reports* 10.1 (2020), p. 1-14.
- [49] RE WAGNER. « Fourier Transform Microscope ». In : *Clever Optics : Innovative Applications of Optics*. T. 126. International Society for Optics et Photonics. 1977, p. 129-131.
- [50] YoungJu JO, Sangjin PARK, JaeHwang JUNG, Jonghee YOON, Hosung JOO, Minhyeok KIM, Suk-Jo KANG, Myung Chul CHOI, Sang Yup LEE et YongKeun PARK. « Holographic deep learning for rapid optical screening of anthrax spores ». In : *Science advances* 3.8 (2017), e1700606.
- [51] Ayan SINHA, Justin LEE, Shuai LI et George BARBASTATHIS. « Lensless computational imaging through deep learning ». In : *Optica* 4.9 (2017), p. 1117-1125.
- [52] Aydogan OZCAN et Euan McLEOD. « Lensless imaging and sensing ». In : *Annual review of biomedical engineering* 18 (2016), p. 77-102.
- [53] Ramona CORMAN, Willem BOUTU, Anna CAMPALANS, Pablo RADICELLA, Joana DUARTE, Maria KHOLODTSOVA, Laure BALLY-CUIF, Nicolas DRAY, Fabrice HARMS, Guillaume DOVILLAIRE et al. « Lensless microscopy platform for single cell and tissue visualization ». In : *Biomedical optics express* 11.5 (2020), p. 2806-2817.
- [54] Joseph W GOODMAN. *Introduction to Fourier optics*. Roberts et Company Publishers, 2005.
- [55] Yichen WU et Aydogan OZCAN. « Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring ». In : *Methods* 136 (2018), p. 4-16.

- [56] Noël BONNET. « Some trends in microscope image processing ». In : *Micron* 35.8 (2004), p. 635-653.
- [57] Toshimori KITAMI, David J LOGAN, Joseph NEGRI, Thomas HASAKA, Nicola J TOLLIDAY, Anne E CARPENTER, Bruce M SPIEGELMAN et Vamsi K MOOTHA. « A chemical screen probing the relationship between mitochondrial content and cell size ». In : *PloS one* 7.3 (2012), e33755.
- [58] Shantanu SINGH, Anne E CARPENTER et Auguste GENOVESIO. « Increasing the content of high-content screening : an overview ». In : *Journal of biomolecular screening* 19.5 (2014), p. 640-650.
- [59] Jason RIORDON, Dušan SOVILJ, Scott SANNER, David SINTON et Edmond WK YOUNG. « Deep learning with microfluidics for biotechnology ». In : *Trends in biotechnology* 37.3 (2019), p. 310-324.
- [60] Keondo LEE, Seong-Eun KIM, Junsang DOH, Keehoon KIM et Wan Kyun CHUNG. « User-friendly image-activated microfluidic cell sorting technique using an optimized, fast deep learning algorithm ». In : *Lab on a Chip* (2021).
- [61] Vadim ZINCHUK et Olga GROSSENBACHER-ZINCHUK. « Machine learning for analysis of microscopy images : A practical guide ». In : *Current protocols in cell biology* 86.1 (2020), e101.
- [62] Paul VILLOUTREIX. « What machine learning can do for developmental biology ». In : *Development* 148.1 (2021).
- [63] Lucas von CHAMIER, Romain F LAINE, Johanna JUKKALA, Christoph SPAHN, Daniel KRENTZEL, Elias NEHME, Martina LERCHE, Sara HERNÁNDEZ-PÉREZ, Pieta K MATTILA, Eleni KARINOÛ et al. « Democratising deep learning for microscopy with ZeroCostDL4Mic ». In : *Nature Communications* 12.1 (2021), p. 1-18.
- [64] Yi GU, Alex Ce ZHANG, Yuanyuan HAN, Jie LI, Clark CHEN et Yu-Hwa LO. « Machine learning based real-time image-guided cell sorting and classification ». In : *Cytometry Part A* 95.5 (2019), p. 499-509.
- [65] Shyam LAL, Devikalyan DAS, Kumar ALABHYA, Anirudh KANFADE, Aman KUMAR et Jyoti KINI. « NucleiSegNet : Robust deep learning architecture for the nuclei segmentation of liver cancer histopathology images ». In : *Computers in Biology and Medicine* 128 (2021), p. 104075.
- [66] Zaozao CHEN, Ning MA, Xiaowei SUN, Qiwei LI, Yi ZENG, Fei CHEN, Shiqi SUN, Jun XU, Jing ZHANG, Huan YE et al. « Automated evaluation of tumor spheroid behavior in 3D culture using deep learning-based recognition ». In : *Biomaterials* 272 (2021), p. 120770.
- [67] Martin WEIGERT, Uwe SCHMIDT, Robert HAASE, Ko SUGAWARA et Gene MYERS. « Star-convex polyhedra for 3d object detection and segmentation in microscopy ». In : *The IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision*. 2020, p. 3666-3673.
- [68] Weigert ET AL. « Content-aware image restoration : pushing the limits of fluorescence microscopy ». In : *Nature methods* 15.12 (2018), p. 1090-1097.

- [69] Paul KEFER, Fadil IQBAL, Maelle LOCATELLI, Josh LAWRIMORE, Mengdi ZHANG, Kerry BLOOM, Keith BONIN, Pierre-Alexandre VIDÉ et Jing LIU. « Performance of deep learning restoration methods for the extraction of particle dynamics in noisy microscopy image sequences ». In : *Molecular Biology of the Cell* 32.9 (2021), p. 903-914.
- [70] Zafran Hussain SHAH, Marcel MÜLLER, Tung-Cheng WANG, Philip Maurice SCHEIDIG, Axel SCHNEIDER, Mark SCHÜTTPELZ, Thomas HUSER et Wolfram SCHENCK. « Deep-learning based denoising and reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy images ». In : *Photonics Research* 9.5 (2021), B168-B181.
- [71] Robert M SUTHERLAND. « Cell and environment interactions in tumor microregions : the multicell spheroid model ». In : *Science* 240.4849 (1988), p. 177-184.
- [72] Ana S NUNES, Andreia S BARROS, Elisabete C COSTA, André F MOREIRA et Ilídio J CORREIA. « 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs ». In : *Biotechnology and bioengineering* 116.1 (2019), p. 206-226.
- [73] Frédérique MITTLER, Patricia OBEÏD, Anastasia V RULINA, Vincent HAGUET, Xavier GIDROL et Maxim Y BALAKIREV. « High-content monitoring of drug effects in a 3D spheroid model ». In : *Frontiers in oncology* 7 (2017), p. 293.
- [74] Sigrid A LANGHANS. « Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning ». In : *Frontiers in pharmacology* 9 (2018), p. 6.
- [75] Rasheena EDMONDSON, Jessica Jenkins BROGLIE, Audrey F ADCOCK et Liju YANG. « Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors ». In : *Assay and drug development technologies* 12.4 (2014), p. 207-218.
- [76] Tijmen H BOOIJ, Leo S PRICE et Erik HJ DANEN. « 3D cell-based assays for drug screens : challenges in imaging, image analysis, and high-content analysis ». In : *SLAS DISCOVERY : Advancing Life Sciences R&D* 24.6 (2019), p. 615-627.
- [77] Geeta MEHTA, Amy Y HSIAO, Marylou INGRAM, Gary D LUKER et Shuichi TAKAYAMA. « Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy ». In : *Journal of controlled release* 164.2 (2012), p. 192-204.
- [78] Johanna F DEKKERS, Maria ALIEVA, Lianne M WELLENS, Hendrikus CR ARIESE, Paul R JAMIESON, Annelotte M VONK, Gimano D AMATNGALIM, Huili HU, Koen C OOST, Hugo JG SNIPPET et al. « High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids ». In : *Nature protocols* 14.6 (2019), p. 1756.
- [79] Ludovico SILVESTRI, Irene COSTANTINI, Leonardo SACCONI et Francesco Saverio PAVONE. « Clearing of fixed tissue : a review from a microscopist's perspective ». In : *Journal of biomedical optics* 21.8 (2016), p. 081205.
- [80] Yih Yang CHEN, Pamuditha N SILVA, Abdullah Muhammad SYED, Shrey SINDHWANI, Jonathan V ROCHELEAU et Warren CW CHAN. « Clarifying intact 3D tissues on a microfluidic chip for high-throughput structural analysis ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.52 (2016), p. 14915-14920.

- [81] Tomas Silva SANTISTEBAN, Omid RABAJANIA, Iana KALININA, Stephen ROBINSON et Matthias MEIER. « Rapid spheroid clearing on a microfluidic chip ». In : *Lab on a Chip* 18.1 (2018), p. 153-161.
- [82] Elisabete C COSTA, Daniel N SILVA, André F MOREIRA et Ilídio J CORREIA. « Optical clearing methods : An overview of the techniques used for the imaging of 3D spheroids ». In : *Biotechnology and bioengineering* 116.10 (2019), p. 2742-2763.
- [83] Luís Manuel Couto OLIVEIRA et Valery Victorovich TUCHIN. *The Optical Clearing Method : A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*. Springer Nature, 2019.
- [84] Molly E BOUTIN et Diane HOFFMAN-KIM. « Application and assessment of optical clearing methods for imaging of tissue-engineered neural stem cell spheres ». In : *Tissue Engineering Part C : Methods* 21.3 (2015), p. 292-302.
- [85] Elina NÜRNBERG, Mario VITACOLONNA, Julia KLINKS, Elena von MOLITOR, Tiziana CESETTI, Florian KELLER, Roman BRUCH, Torsten ERTONGUR-FAUTH, Katja RIEDEL, Paul SCHOLZ et al. « Routine Optical Clearing of 3D-Cell Cultures : Simplicity Forward ». In : *Frontiers in Molecular Biosciences* 7 (2020), p. 20.
- [86] Peng WAN, Jingtian ZHU, Jianyi XU, Yusha LI, Tingting YU et Dan ZHU. « Evaluation of seven optical clearing methods in mouse brain ». In : *Neurophotonics* 5.3 (2018), p. 035007.
- [87] Oksana SIRENKO, Trisha MITLO, Jayne HESLEY, Steve LUKE, Windsor OWENS et Evan F CROMWELL. « High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures ». In : *Assay and drug development technologies* 13.7 (2015), p. 402-414.
- [88] Leo Li-Ying CHAN, Scott CRIBBES, Sarah KESSEL, Scott McMENEMY et Jean QIU. *A high-throughput 3D tumor spheroid screening method for drug discovery using imaging cytometry*. 2017.
- [89] Jason E EKERT, Kjell JOHNSON, Brandy STRAKE, Jose PARDINAS, Stephen JARANTOW, Robert PERKINSON et David C COLTER. « Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro—implication for drug development ». In : *PLoS one* 9.3 (2014), e92248.
- [90] Wenjin CHEN, Chung WONG, Evan VOSBURGH, Arnold J LEVINE, David J FORAN et Eugenia Y XU. « High-throughput image analysis of tumor spheroids : a user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately ». In : *Journal of Visualized Experiments (JoVE)* 89 (2014), e51639.
- [91] Maria VINCI, Sharon GOWAN, Frances BOXALL, Lisa PATTERSON, Miriam ZIMMERMANN, Cara LOMAS, Marta MENDIOLA, David HARDISSON, Suzanne A ECCLES et al. « Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation ». In : *BMC biology* 10.1 (2012), p. 29.
- [92] Haneen ALSEHLI, Fuad MOSIS, Christopher THOMSON, Eva HAMRUD, Erika WISEMAN, Eileen GENTLEMAN et Davide DANONI. « An integrated pipeline for high-throughput screening and profiling of spheroids using simple live image analysis of frame to frame variations ». In : *Methods* (2020).

- [93] Molly E BOUTIN, Ty C Voss, Steven A TITUS, Kennie CRUZ-GUTIERREZ, Sam MICHAEL et Marc FERRER. « A high-throughput imaging and nuclear segmentation analysis protocol for cleared 3D culture models ». In : *Scientific reports* 8.1 (2018), p. 1-14.
- [94] Biena MATHEW, Alexander SCHMITZ, Silvia MUÑOZ-DESCALZO, Nariman ANSARI, FRANCESCO PAMPALONI, Ernst HK STELZER et Sabine C FISCHER. « Robust and automated three-dimensional segmentation of densely packed cell nuclei in different biological specimens with Lines-of-Sight decomposition ». In : *BMC bioinformatics* 16.1 (2015), p. 187.
- [95] Michaël BARBIER, Steffen JAENSCH, Frans CORNELISSEN, Suzana VIDIC, Kjersti GJERDE, Ronald de HOOGT, Ralph GRAESER, Emmanuel GUSTIN, Yolanda T CHONG et IMI PREDECT CONSORTIUM. « Ellipsoid segmentation model for analyzing light-attenuated 3D confocal image stacks of fluorescent multi-cellular spheroids ». In : *PloS one* 11.6 (2016), e0156942.
- [96] Kenneth W DUNN, Chichen FU, David Joon Ho, Soonam LEE, Shuo HAN, Paul SALAMA et Edward J DELP. « DeepSynth : Three-dimensional nuclear segmentation of biological images using neural networks trained with synthetic data ». In : *Scientific reports* 9.1 (2019), p. 1-15.
- [97] Ervin A TASNADI, Timea TOTH, Maria KOVACS, Akos DIOSDI, FRANCESCO PAMPALONI, Jozsef MOLNAR, Filippo PICCININI et Peter HORVATH. « 3D-Cell-Annotator : an open-source active surface tool for single-cell segmentation in 3D microscopy images ». In : *Bioinformatics* 36.9 (2020), p. 2948-2949.
- [98] Filippo PICCININI, Tamas BALASSA, Antonella CARBONARO, Akos DIOSDI, Timea TOTH, Nikita MOSHKOV, Ervin A TASNADI et Peter HORVATH. « Software tools for 3D nuclei segmentation and quantitative analysis in multicellular aggregates ». In : *Computational and Structural Biotechnology Journal* (2020).
- [99] Bastien KOVAC, Jérôme FEHRENBACH, Ludivine GUILLAUME et Pierre WEISS. « FitEllipsoid : a fast supervised ellipsoid segmentation plugin ». In : *BMC bioinformatics* 20.1 (2019), p. 1-8.
- [100] Alexander SCHMITZ, Sabine C FISCHER, Christian MATTHEYER, FRANCESCO PAMPALONI et Ernst HK STELZER. « Multiscale image analysis reveals structural heterogeneity of the cell microenvironment in homotypic spheroids ». In : *Scientific reports* 7.1 (2017), p. 1-13.
- [101] Bhawna GOYAL, Ayush DOGRA, Sunil AGRAWAL, BS SOHI et Apoorav SHARMA. « Image denoising review : From classical to state-of-the-art approaches ». In : *Information Fusion* 55 (2020), p. 220-244.
- [102] Fuyong XING et Lin YANG. « Robust nucleus/cell detection and segmentation in digital pathology and microscopy images : a comprehensive review ». In : *IEEE reviews in biomedical engineering* 9 (2016), p. 234-263.
- [103] Yu TOYOSHIMA, Terumasa TOKUNAGA, Osamu HIROSE, Manami KANAMORI, Takayuki TERAMOTO, Moon Sun JANG, Sayuri KUGE, Takeshi ISHIHARA, Ryo YOSHIDA et Yuichi IINO. « Accurate automatic detection of densely distributed cell nuclei in 3D space ». In : *PLoS computational biology* 12.6 (2016), e1004970.

- [104] Lipeng XIE, Jin QI, Lili PAN et Samad WALLI. « Integrating deep convolutional neural networks with marker-controlled watershed for overlapping nuclei segmentation in histopathology images ». In : *Neurocomputing* 376 (2020), p. 166-179.
- [105] Uwe SCHMIDT, Martin WEIGERT, Coleman BROADDUS et Gene MYERS. « Cell detection with star-convex polygons ». In : *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. Springer. 2018, p. 265-273.
- [106] Peter NAYLOR, Marick LAÉ, Fabien REYAL et Thomas WALTER. « Segmentation of nuclei in histopathology images by deep regression of the distance map ». In : *IEEE transactions on medical imaging* 38.2 (2018), p. 448-459.
- [107] Hwejin JUNG, Bilal LODHI et Jaewoo KANG. « An automatic nuclei segmentation method based on deep convolutional neural networks for histopathology images ». In : *BMC Biomedical Engineering* 1.1 (2019), p. 24.
- [108] Daniel JIMENEZ-CARRETERO, Vahid ABRISHAMI, Laura Fernández-de MANUEL, Irene PALACIOS, Antonio QUÍLEZ-ÁLVAREZ, Alberto DíEZ-SÁNCHEZ, Miguel A DEL POZO et María C MONTOYA. « Tox_ (R) CNN : Deep learning-based nuclei profiling tool for drug toxicity screening ». In : *PLoS computational biology* 14.11 (2018), e1006238.
- [109] Linfeng YANG, Rajarshi P GHOSH, J Matthew FRANKLIN, Simon CHEN, Chenyu YOU, Raja R NARAYAN, Marc L MELCHER et Jan T LIPHARDT. « NuSeT : A deep learning tool for reliably separating and analyzing crowded cells ». In : *PLoS computational biology* 16.9 (2020), e1008193.
- [110] Sajith KECHERIL SADANANDAN, Johan KARLSSON et Carolina WAHLBY. « Spheroid segmentation using multiscale deep adversarial networks ». In : *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision Workshops*. 2017, p. 36-41.
- [111] Mina KHOSHDELI, Garrett WINKELMAIER et Bahram PARVIN. « Multilayer Encoder-Decoder Network for 3D Nuclear Segmentation in Spheroid Models of Human Mammary Epithelial Cell Lines ». In : *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops*. 2018, p. 2239-2245.
- [112] Linas MAZUTIS, John GILBERT, W Lloyd UNG, David A WEITZ, Andrew D GRIFFITHS et John A HEYMAN. « Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics ». In : *Nature protocols* 8.5 (2013), p. 870-891.
- [113] Xiaoyun FAN, Chunping JIA, Jun YANG, Gang LI, Hongju MAO, Qinghui JIN et Jianlong ZHAO. « A microfluidic chip integrated with a high-density PDMS-based microfiltration membrane for rapid isolation and detection of circulating tumor cells ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 71 (2015), p. 380-386.
- [114] Liang HUANG, Shengtai BIAN, Yinuo CHENG, Guanya SHI, Peng LIU, Xiongying YE et Wenhui WANG. « Microfluidics cell sample preparation for analysis : Advances in efficient cell enrichment and precise single cell capture ». In : *Biomicrofluidics* 11.1 (2017), p. 011501.
- [115] Joseph N MAIT, Gary W EULISS et Ravindra A ATHALE. « Computational imaging ». In : *Advances in Optics and Photonics* 10.2 (2018), p. 409-483.

- [116] Oliver G McDONALD, Tyler SAUNDERS, Rakel TRYGGVADOTTIR, Samantha J MENTCH, Andrew P FEINBERG et al. « Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis ». In : *Nature Genetics* 49.3 (2017), p. 367 -376.
- [117] Alvin P MAKOHON-MOORE, Ming ZHANG, Johannes G REITER, Ivana BOZIC, Benjamin ALLEN, Deepanjan KUNDU, Krishnendu CHATTERJEE, Fay WONG, Yuchen JIAO, Zachary A KOHUTEK et al. « Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer ». In : *Nature genetics* 49.3 (2017), p. 358-366.
- [118] Robert A BEAGRIE, Antonio SCIALDONE, Markus SCHUELER, Dorothee CA KRAEMER, Mita CHOTALIA, Sheila Q XIE, Mariano BARBIERI, Inês de SANTIAGO, Liron-Mark LAVITAS, Miguel R BRANCO et al. « Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping ». In : *Nature* 543.7646 (2017), p. 519-524.
- [119] BA PIERCE et RM BOURDON. « Genetics-A Conceptual Approach ». In : *Freeman* (2004).
- [120] James PAWLEY. *Handbook of biological confocal microscopy*. T. 236. Springer Science & Business Media, 2006.
- [121] Emmanuel G REYNAUD, Jan PEYCHL, Jan HUISKEN et Pavel TOMANCAK. « Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists ». In : *Nature methods* 12.1 (2015), p. 30-34.
- [122] Rory M POWER et Jan HUISKEN. « A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging ». In : *Nature methods* 14.4 (2017), p. 360-373.
- [123] Omar E OLARTE, Jordi ANDILLA, Emilio J GUALDA et Pablo LOZA-ALVAREZ. « Light-sheet microscopy : a tutorial ». In : *Advances in Optics and Photonics* 10.1 (2018), p. 111-179.
- [124] Emilio J GUALDA, Hugo PEREIRA, Gabriel G MARTINS, Rui GARDNER et Nuno MORENO. « Three-dimensional imaging flow cytometry through light-sheet fluorescence microscopy ». In : *Cytometry Part A* 91.2 (2017), p. 144-151.
- [125] Raju REGMI, Kavya MOHAN et Partha Pratim MONDAL. « High resolution light-sheet based high-throughput imaging cytometry system enables visualization of intra-cellular organelles ». In : *AIP Advances* 4.9 (2014), p. 097125.
- [126] Emilio J GUALDA, Hugo PEREIRA, Tiago VALE, Marta Falcão ESTRADA, Catarina BRITO et Nuno MORENO. « SPIM-fluid : open source light-sheet based platform for high-throughput imaging ». In : *Biomedical Optics Express* 6.11 (2015), p. 4447-4456.
- [127] Taichi MIURA, Hideharu MIKAMI, Akihiro ISOZAKI, Takuro ITO, Yasuyuki OZEKI et Keisuke GODA. « On-chip light-sheet fluorescence imaging flow cytometry at a high flow speed of 1 m/s ». In : *Biomedical optics express* 9.7 (2018), p. 3424-3433.
- [128] Marjolein BM MEDDENS, Sheng LIU, Patrick S FINNEGAN, Thayne L EDWARDS, Conrad D JAMES et Keith A LIDKE. « Single objective light-sheet microscopy for high-speed whole-cell 3D super-resolution ». In : *Biomedical Optics Express* 7.6 (2016), p. 2219-2236.

- [129] Ahmad Ali MANZOOR, Lauren ROMITA et Dae Kun HWANG. « A review on micro-well and microfluidic geometric array fabrication techniques and its potential applications in cellular studies ». In : *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 99.1 (2021), p. 61-96.
- [130] Vittoria POLI, Luca FAGNOCCHI, Alessandra FASCIANI, Alessandro CHERUBINI, Stefania MAZZOLENI, Sara FERRILLO, Annarita MILUZIO, Gabriella GAUDIOSO, Valentina VAIRA, Alice TURDO et al. « MYC-driven epigenetic reprogramming favors the onset of tumorigenesis by inducing a stem cell-like state ». In : *Nature communications* 9.1 (2018), p. 1-16.
- [131] Jovana PAUNOVIC, Danijela VUCEVIC, Tatjana RADOSAVLJEVIC, Senka PANTIC, Milena VESKOVIC et Igor PANTIC. « Gray-level co-occurrence matrix analysis of chromatin architecture in periportal and perivenous hepatocytes ». In : *Histochemistry and cell biology* 151.1 (2019), p. 75 -83.
- [132] Andreas KLEPPE, Fritz ALBREGTSEN, Ljiljana VLATKOVIC et al. « Chromatin organisation and cancer prognosis : a pan-cancer study ». In : *The Lancet Oncology* 19.3 (2018), p. 356 -369.
- [133] Jianquan XU et Yang LIU. « A guide to visualizing the spatial epigenome with super-resolution microscopy ». In : *The FEBS journal* (2019). DOI : 10.1111/febs.14938.
- [134] Juliette GRIFFIÉ, Michael SHANNON, Claire L. BROMLEY, Lies BOELEN, Garth L. BURN et al. « A Bayesian cluster analysis method for single-molecule localization microscopy data ». In : *Nature Protocols* 11.12 (2016), p. 2499 -2514.
- [135] EM MANDERS, J STAP, GJ BRAKENHOFF, R VAN DRIEL et JA ATEN. « Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy ». In : *Journal of cell science* 103.3 (1992), p. 857-862.
- [136] Andrew P FRENCH, Steven MILLS, Ranjan SWARUP, Malcolm J BENNETT et Tony P PRIDMORE. « Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells ». In : *Nature protocols* 3.4 (2008), p. 619.
- [137] Thibault LAGACHE, Alexandre GRASSART, Stéphane DALLONGEVILLE, Orestis FAKLARIS, Nathalie SAUVONNET, Alexandre DUFOUR, Lydia DANGLLOT et Jean-Christophe OLIVO-MARIN. « Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics ». In : *Nature communications* 9.1 (2018), p. 1-15.
- [138] Dylan M OWEN, David J WILLIAMSON, Lies BOELEN, Astrid MAGENAU, Jérémie ROSSY et Katharina GAUS. « Quantitative analysis of three-dimensional fluorescence localization microscopy data ». In : *Biophysical journal* 105.2 (2013), p. L05-L07.
- [139] Leonid ANDRONOV, Igor ORLOV, Yves LUTZ, Jean-Luc VONESCH et Bruno P KLAHOLZ. « ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy ». In : *Scientific reports* 6.1 (2016), p. 1-9.
- [140] Yoav AMINOV. « "Find the Best Distribution" tool (FBD) ». In : *MATLAB Central File Exchange* (2019). URL : <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/36000-fbd-find-the-best-distribution-tool>.

- [141] Gideon SCHWARZ. « Estimating the dimension of a model ». In : *The Annals of Statistics* 6.2 (1978), p. 461 -464.
- [142] Andrew A NEATH et Joseph E CAVANAUGH. « The Bayesian information criterion : background, derivation, and applications ». In : *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Statistics* 4.2 (2012), p. 199-203.
- [143] Kristin HANSSON, Mehrdad JAFARI-MAMAGHANI et Patrik KRIEGER. « RipleyGUI : software for analyzing spatial patterns in 3D cell distributions ». In : *Frontiers in Neuroinformatics* 7 (2013), p. 5 -14.
- [144] Mohamed AMGAD, Anri ITOH et Marco Man Kin. TSUI. « Extending Ripley's K-function to Quantify Aggregation in 2-D Grayscale images ». In : *PloS one* 10.12 (2015), e0144404.
- [145] Aubin SAMACOITS, Racha CHOUAIB, Adham SAFIEDDINE, Abdel-Meneem TRABOULSI, Wei OUYANG, Christophe ZIMMER et al. « A computational framework to study sub-cellular RNA localization ». In : *Nature Communications* 9.1 (2018), p. 4584.
- [146] Thibault LAGACHE, Gabriel LANG, Nathalie SAUVONNET et Jean-Christophe OLIVOMARIN. « Analysis of the spatial organization of molecules with robust statistics ». In : *PloS one* 8.12 (2013), e80914.
- [147] JE BESAG. « Comments on Ripley's paper : Royal Statistical Society ». In : *Journal* 39 (1977), p. 193-195.
- [148] Majid MIRMEHDI. *Handbook of texture analysis*. Imperial College Press, 2008.
- [149] David L. KOLIN et Paul WISEMAN. « Advances in image correlation spectroscopy : measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells ». In : *Cell Biochemistry and Biophysics* 49.3 (2007), p. 141 -164.
- [150] Claire ROBERTSON et Steven C. GEORGE. « Theory and practical recommendations for autocorrelation-based image correlation spectroscopy ». In : *Journal of Biomedical Optics* 17.8 (2012), p. 080801.
- [151] Robert M HARALICK, Karthikeyan SHANMUGAM et al. « Textural features for image classification ». In : *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 3.6 (1973), p. 610 -621.
- [152] Chen Change LOY, Ke CHEN, Shaogang GONG et Tao XIANG. « Crowd counting and profiling : Methodology and evaluation ». In : *Modeling, simulation and visual analysis of crowds*. Springer, 2013, p. 347-382.
- [153] Arati S KURANI, Dong-Hui XU, Jacob FURST et Daniela Stan RAICU. « Co-occurrence matrices for volumetric data ». In : *Heart* 27 (2004), p. 25.
- [154] Timo OJALA, Matti PIETIKÄINEN et Topi MÄENPÄÄ. « Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns ». In : *IEEE Transactions on Pattern Analysis & Machine Intelligence* 24.7 (2002), p. 971 -987.
- [155] Xiang XU, Xingkun WU et Feng LIN. *Cellular Image Classification*. Springer, 2017.
- [156] Guoying ZHAO et Matti PIETIKAINEN. « Dynamic texture recognition using local binary patterns with an application to facial expressions ». In : *IEEE Transactions on Pattern Analysis & Machine Intelligence* 6 (2007), p. 915-928.

- [157] Guoying ZHAO et Matti PIETIKÄINEN. « Dynamic texture recognition using volume local binary patterns ». In : *Dynamical Vision*. Springer, 2006, p. 165-177.
- [158] Joan BRUNA et Stéphane MALLAT. « Invariant scattering convolution networks ». In : *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 35.8 (2013), p. 1872-1886.
- [159] Alain RAKOTOMAMONJY, Caroline PETITJEAN, Mathieu SALAÜN et Luc THIBERVILLE. « Scattering features for lung cancer detection in fibered confocal fluorescence microscopy images ». In : *Artificial intelligence in medicine* 61.2 (2014), p. 105-118.
- [160] Joan BRUNA et Stéphane MALLAT. « Classification with scattering operators ». In : *CVPR 2011*. IEEE. 2011, p. 1561-1566.
- [161] Pejman RASTI, Ali AHMAD, Salma SAMIEL, Etienne BELIN et David ROUSSEAU. « Supervised Image Classification by Scattering Transform with Application to Weed Detection in Culture Crops of High Density ». In : *Remote Sensing* 11.3 (2019), p. 249.
- [162] Marti A. HEARST, Susan T DUMAIS, Edgar OSUNA, John PLATT et Bernhard SCHOLKOPF. « Support vector machines ». In : *IEEE Intelligent Systems and their applications* 13.4 (1998), p. 18-28.
- [163] Ingo STEINWART et Andreas CHRISTMANN. *Support vector machines*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [164] Ragav VENKATESAN et Baoxin LI. *Convolutional neural networks in visual computing : a concise guide*. CRC Press, 2017.
- [165] Jianxin WU. « Introduction to convolutional neural networks ». In : *National Key Lab for Novel Software Technology. Nanjing University. China* 5.23 (2017), p. 495.
- [166] Ali AHMAD, Carole FRINDEL et David ROUSSEAU. « Detecting differences of fluorescent markers distribution in single cell microscopy : textural or pointillist feature space? » In : *Frontiers in Robotics and AI* 7 (2020), p. 39.
- [167] Tim J STEVENS, David LANDO, Srinjan BASU, Liam P ATKINSON, Yang CAO, Steven F LEE, Martin LEEB, Kai J WOHLFAHRT, Wayne BOUCHER, Aoife O'SHAUGHNESSY-KIRWAN et al. « 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C ». In : *Nature* 544.7648 (2017), p. 59-64.
- [168] Sharmistha KUNDU, Fei JI, Hongjae SUNWOO, Gaurav JAIN, Jeannie T LEE, Ruslan I SADREYEV, Job DEKKER et Robert E KINGSTON. « Polycomb repressive complex 1 generates discrete compacted domains that change during differentiation ». In : *Molecular cell* 65.3 (2017), p. 432-446.
- [169] Alistair N BOETTIGER, Bogdan BINTU, Jeffrey R MOFFITT, Siyuan WANG, Brian J BELIVEAU, Geoffrey FUDENBERG, Maxim IMAKAEV, Leonid A MIRNY, Chao-ting WU et Xiaowei ZHUANG. « Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states ». In : *Nature* 529.7586 (2016), p. 418-422.
- [170] Sung Ryul LEE et Jin HAN. « Mitochondrial nucleoid : shield and switch of the mitochondrial genome ». In : *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017 (2017).

- [171] Arnaud CHEVROLLIER, Julien CASSEREAU, Marc FERRÉ, Jennifer ALBAN, Valérie DESQUIRET-DUMAS, Naïg GUEGUEN, Patrizia AMATI-BONNEAU, Vincent PROCACCIO, Dominique BONNEAU et Pascal REYNIER. « Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function ». In : *The international journal of biochemistry & cell biology* 44.6 (2012), p. 980-988.
- [172] Patrick RUBIN-DELANCHY, Garth L BURN, Juliette GRIFFIÉ, David J WILLIAMSON, Nicholas A HEARD, Andrew P COPE et Dylan M OWEN. « Bayesian cluster identification in single-molecule localization microscopy data ». In : *Nature Methods* 12.11 (2015), 1072–1076.
- [173] Antti LEHMUSSOLA, Pekka RUUSUVUORI, Jyrki SELINUMMI, Heikki HUTTUNEN et Olli YLI-HARJA. « Computational framework for simulating fluorescence microscope images with cell populations ». In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 26.7 (2007), p. 1010-1016.
- [174] Hongqiang MA, Jianquan XU et Yang LIU. « WindSTORM : Robust online image processing for high-throughput nanoscopy ». In : *Science Advances* 5.4 (2019), eaaw0683.
- [175] Peter J. DIGGLE. *Statistical Analysis of Spatial Point Patterns*. UK, London : Academic Press, 1983.
- [176] Ignacio ARGANDA-CARRERAS, Verena KAYNIG, Curtis RUEDEN, Kevin W ELICEIRI, Johannes SCHINDELIN, Albert CARDONA et H SEBASTIAN SEUNG. « Trainable Weka Segmentation : a machine learning tool for microscopy pixel classification ». In : *Bioinformatics* 33.15 (2017), p. 2424-2426.
- [177] Martin OVESNÝ, Pavel KRÍŽEK, Josef BORKOVEC, Zdenek ŠVINDRYCH et Guy M. HAGEN. « ThunderSTORM : a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging ». In : *Bioinformatics* 30.16 (2014), p. 2389 -2390.
- [178] Seamus J. HOLDEN, Stephan UPHOFF et Achillefs N KAPANIDIS. « DAOSTORM : an algorithm for high-density super-resolution microscopy ». In : *Nature Methods* 8.4 (2011), p. 279 -280.
- [179] Junhong MIN, Cédric VONESCH, Hagai KIRSHNER, Lina CARLINI, Nicolas OLIVIER, Seamus HOLDEN, Suliana MANLEY, Jong Chul YE et Michael UNSER. « FALCON : fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data ». In : *Scientific reports* 4.1 (2014), p. 1-9.
- [180] Simon GAZAGNES, Emmanuel SOUBIES et Laure BLANC-FERAUD. « High density molecule localization for super-resolution microscopy using CEL0 based sparse approximation ». In : *In 2017 IEEE 14th International Symposium on Biomedical Imaging* (2017), p. 28 -31.
- [181] Daniel SAGE, Hagai KIRSHNER, Thomas PENGO, Nico STUURMAN, Junhong MIN, Suliana MANLEY et Michael UNSER. « Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy ». In : *Nature methods* 12.8 (2015), p. 717-724.

- [182] Daniel SAGE, Thanh-An PHAM, Hazen BABCOCK, Tomas LUKES, Thomas PENGO, Jerry CHAO, Ramraj VELMURUGAN, Alex HERBERT, Anurag AGRAWAL, Silvia COLABRESE et al. « Super-resolution fight club : assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software ». In : *Nature methods* 16.5 (2019), p. 387-395.
- [183] Sébastien MAILFERT, Jérôme TOUVIER, Lamia BENYOUSSEF, Roxane FABRE, Asma RABAOUI, Marie-Claire BLACHE, Yannick HAMON, Sophie BRUSTLEIN, Serge MONNERET, Didier MARGUET et al. « A theoretical high-density nanoscopy study leads to the design of UNLOC, a parameter-free algorithm ». In : *Biophysical journal* 115.3 (2018), p. 565 -576.
- [184] Adel HAFIANE, Guna SEETHARAMAN et Bertrand ZAVIDOVIQUE. « Median binary pattern for textures classification ». In : *International Conference Image Analysis and Recognition*. Springer. 2007, p. 387-398.
- [185] Xiaoyang TAN et Bill TRIGGS. « Enhanced local texture feature sets for face recognition under difficult lighting conditions ». In : *IEEE transactions on image processing* 19.6 (2010), p. 1635-1650.
- [186] Ali AHMAD, Carole FRINDEL et David ROUSSEAU. « Sorting cells from fluorescent markers organization in confocal microscopy : 3D versus 2D images ». In : *2020 Tenth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA)*. IEEE. 2020, p. 1-6.
- [187] Ali AHMAD, Guillaume VANEL, Carole FRINDEL et David ROUSSEAU. « Assessing diffractive imaging for the cytometry of cells ». In : *The IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. IEEE. 2021.
- [188] Marco TEKTONIDIS, Il-Han KIM, Yi-Chun M CHEN, Roland EILS, David L SPECTOR et Karl ROHR. « Non-rigid multi-frame registration of cell nuclei in live cell fluorescence microscopy image data ». In : *Medical image analysis* 19.1 (2015), p. 1-14.
- [189] Carl BARTON, Sandro MORGANELLA, Øyvind ØDEGÅRD-FOUGNER, Stephanie ALEXANDER, Jonas RIES, Tomas FITZGERALD, Jan ELLENBERG et Ewan BIRNEY. « ChromoTrace : Computational reconstruction of 3D chromosome configurations for super-resolution microscopy ». In : *PLoS computational biology* 14.3 (2018), e1006002.
- [190] R. D. KORNBERG et Y. LORCH. « Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome ». In : *Cell* 98.3 (1999), p. 285-294.
- [191] Josh LAWRIK, Joseph K AICHER, Patrick HAHN, Alyona FULP, Ben KOMPA, Leandra VICCI, Michael FALVO, Russell M TAYLOR et Kerry BLOOM. « Chromo-Shake : a chromosome dynamics simulator reveals that chromatin loops stiffen centromeric chromatin ». In : *Molecular biology of the cell* 27.1 (2016), p. 153-166.
- [192] S. WANG, J. XU et J. ZENG. « Inferential modeling of 3D chromatin structure ». In : *Nucleic acids research* 43.8 (2015), e54-e54.
- [193] David SVOBODA, Vladimír ULMAN et Igor PETERLÍK. « On proper simulation of chromatin structure in static images as well as in time-lapse sequences in fluorescence microscopy ». In : *2015 IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. IEEE. 2015, p. 712-716.
- [194] Christian MÜNDEL et Jörg LANGOWSKI. « Chromosome structure predicted by a polymer model ». In : *Physical Review E* 57.5 (1998), p. 5888.

- [195] Alberto DIASPRO et al. *Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances*. T. 1. Wiley-Liss New York, 2002.
- [196] Michael G MEYER, Mark FAUVER, J Richard RAHN, Thomas NEUMANN, Florence W PATTEN, Eric J SEIBEL et Alan C NELSON. « Automated cell analysis in 2D and 3D : A comparative study ». In : *Pattern Recognition* 42.1 (2009), p. 141-146.
- [197] Tomas MAJTNER et David SVOBODA. « Extension of tamura texture features for 3d fluorescence microscopy ». In : *2012 Second International Conference on 3D Imaging, Modeling, Processing, Visualization & Transmission*. IEEE. 2012, p. 301-307.
- [198] Elmoez Ben OTHMEN, Mounir SAYADI et Farhat FNIAECH. « 3 D gray level co-occurrence matrices for volumetric texture classification ». In : *3rd International Conference on Systems and Control*. IEEE. 2013, p. 833-837.
- [199] Tae-Yun KIM, Nam-Hoon CHO, Goo-Bo JEONG, Ewert BENGTSOON et Heung-Kook CHOI. « 3D texture analysis in renal cell carcinoma tissue image grading ». In : *Computational and mathematical methods in medicine 2014* (2014).
- [200] Tie Hua DU, Wee Choo PUAH et Martin WASSER. « Cell cycle phase classification in 3D in vivo microscopy of Drosophila embryogenesis ». In : *BMC bioinformatics*. T. 12. 13. Springer. 2011, p. 1-9.
- [201] Yann LECUN, Yoshua BENGIO et Geoffrey HINTON. « Deep learning ». In : *nature* 521.7553 (2015), p. 436-444.
- [202] S Vinjimore KESAVAN, F MOMEY, O CIONI, B DAVID-WATINE, N DUBRULLE, S SHORTE, E SULPICE, D FREIDA, B CHALMOND, Jean-Marc DINTEN et al. « High-throughput monitoring of major cell functions by means of lensfree video microscopy ». In : *Scientific reports* 4 (2014), p. 5942.
- [203] Fabien MOMEY, Anthony BERDEU, T BORDY, J-M DINTEN, F Kermarrec MARCEL, N PICOLLET-D'HAHAN, X GIDROL et C ALLIER. « Lensfree diffractive tomography for the imaging of 3D cell cultures ». In : *Biomedical optics express* 7.3 (2016), p. 949-962.
- [204] James E SILLIBOURNE, Christian G SPECHT, Ignacio IZEDDIN, Ilse HURBAIN, Phong TRAN, Antoine TRILLER, Xavier DARZACQ, Maxime DAHAN et Michel BORNENS. « Assessing the localization of centrosomal proteins by PALM/STORM nanoscopy ». In : *Cytoskeleton* 68.11 (2011), p. 619-627.
- [205] Stefan W HELL et Jan WICHMANN. « Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy ». In : *Optics letters* 19.11 (1994), p. 780-782.
- [206] Philipp J KELLER, Annette D SCHMIDT, Anthony SANTELLA, Khaled KHAIRY, Zhirong BAO, Joachim WITTBRODT et Ernst HK STELZER. « Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy ». In : *Nature methods* 7.8 (2010), p. 637-642.
- [207] Bi-Chang CHEN, Wesley R LEGANT, Kai WANG, Lin SHAO, Daniel E MILKIE, Michael W DAVIDSON, Chris JANETOPOULOS, Xufeng S WU, John A HAMMER, Zhe LIU et al. « Lattice light-sheet microscopy : imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution ». In : *Science* 346.6208 (2014), p. 1257998.

- [208] Olaf RONNEBERGER, Philipp FISCHER et Thomas BROX. « U-net : Convolutional networks for biomedical image segmentation ». In : *International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention*. Springer. 2015, p. 234-241.
- [209] Alexander KRULL, Tim-Oliver BUCHHOLZ et Florian JUG. « Noise2void-learning denoising from single noisy images ». In : *Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. 2019, p. 2129-2137.
- [210] Peng GAO, Ying MA, Kai WEN, Min LIU, Juanjuan ZHENG, Kaiqin CHU, Zachary J SMITH et Lixin LIU. « Recent Advances in Structured Illumination Microscopy ». In : *Journal of Physics : Photonics* (2021).
- [211] Chien-Hung LU, Nicolas C PÉGARD et Jason W FLEISCHER. « Microfluidic structured illumination microscopy ». In : *Computational Optical Sensing and Imaging*. Optical Society of America. 2012, CM3B-7.
- [212] Wanyoung LIM et Sungsu PARK. « A microfluidic spheroid culture device with a concentration gradient generator for high-throughput screening of drug efficacy ». In : *Molecules* 23.12 (2018), p. 3355.
- [213] David MAYERICH, Michael J WALSH, Andre KADJACSY-BALLA, Partha S RAY, Stephen M HEWITT et Rohit BHARGAVA. « Stain-less staining for computed histopathology ». In : *Technology* 3.01 (2015), p. 27-31.
- [214] Si Hui TAN, Yada SWATHI, Shawna TAN, Jasmine GOH, Ryo SEISHIMA, Kazuhiro MURAKAMI, Masanobu OSHIMA, Toshikatsu TSUJI, Phyllis PHUAH, Liang Thing TAN et al. « AQP5 enriches for stem cells and cancer origins in the distal stomach ». In : *Nature* 578.7795 (2020), p. 437-443.
- [215] Saba GOODARZI, Audrey PRUNET, Fabien ROSSETTI, Olivier TILLEMENT, Erika PORCEL, Sandrine LACOMBE, Ting-Di WU, Jean-Luc GUERQUIN-KERN, Hélène DELANOË-AYARI, François LUX et al. « Quantifying nanotherapeutics penetration using hydrogel based microsystem as a new 3D in-vitro platform ». In : *bioRxiv* (2021).
- [216] Irene COSTANTINI, Jean-Pierre GHOBIL, Antonino Paolo DI GIOVANNA, Anna Letizia Allegra MASCARO, Ludovico SILVESTRI, Marie Caroline MÜLLENBROICH, Leonardo ONOFRI, Valerio CONTI, Francesco VANZI, Leonardo SACCONI et al. « A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging ». In : *Scientific reports* 5 (2015), p. 9808.
- [217] Aurore MASSON, Paul ESCANDE, Céline FRONGIA, Grégory CLOUVEL, Bernard DUCOMMUN et Corinne LORENZO. « High-resolution in-depth imaging of optically cleared thick samples using an adaptive SPIM ». In : *Scientific reports* 5 (2015), p. 16898.
- [218] Stuart BERG, Dominik KUTRA, Thorben KROEGER, Christoph N STRAEHLE, Bernhard X KAUSLER, Carsten HAUBOLD, Martin SCHIEGG, Janez ALES, Thorsten BEIER, Markus RUDY et al. « ilastik : interactive machine learning for (bio)image analysis ». In : *Nature Methods* (2019), p. 1-7.
- [219] Diederik P KINGMA et Jimmy BA. « Adam : A method for stochastic optimization ». In : *arXiv preprint arXiv :1412.6980* (2014).

- [220] Michel GRIMAUD. « New measure of contrast : the dynamics ». In : *Image Algebra and Morphological Image Processing III*. T. 1769. International Society for Optics et Photonics. 1992, p. 292-305.
- [221] Serge BEUCHER et Fernand MEYER. « The morphological approach to segmentation : the watershed transformation ». In : *Mathematical morphology in image processing* 34 (1993), p. 433-481.
- [222] Peter NAYLOR, Marick LAÉ, Fabien REYAL et Thomas WALTER. « Nuclei segmentation in histopathology images using deep neural networks ». In : *2017 IEEE 14th international symposium on biomedical imaging (ISBI 2017)*. IEEE. 2017, p. 933-936.
- [223] Neeraj KUMAR, Ruchika VERMA, Sanuj SHARMA, Surabhi BHARGAVA, Abhishek VAHADANE et Amit SETHI. « A dataset and a technique for generalized nuclear segmentation for computational pathology ». In : *IEEE transactions on medical imaging* 36.7 (2017), p. 1550-1560.
- [224] David A VAN VALEN, Takamasa KUDO, Keara M LANE, Derek N MACKLIN, Nicolas T QUACH, Mialy M DEFELICE, Inbal MAAYAN, Yu TANOUCHI, Euan A ASHLEY et Markus W COVERT. « Deep learning automates the quantitative analysis of individual cells in live-cell imaging experiments ». In : *PLoS computational biology* 12.11 (2016).
- [225] Neeraj KUMAR, Ruchika VERMA, Ashish ARORA, Abhay KUMAR, Sanchit GUPTA, Amit SETHI et Peter H GANN. « Convolutional neural networks for prostate cancer recurrence prediction ». In : *Medical Imaging 2017 : Digital Pathology*. T. 10140. International Society for Optics et Photonics. 2017, 101400H.
- [226] Korsuk SIRINUKUNWATTANA, Shan E Ahmed RAZA, Yee-Wah TsANG, David RJ SNEAD, Ian A CREE et Nasir M RAJPOOT. « Locality sensitive deep learning for detection and classification of nuclei in routine colon cancer histology images ». In : *IEEE transactions on medical imaging* 35.5 (2016), p. 1196-1206.
- [227] Nancy CHINCHOR et Beth M SUNDHEIM. « MUC-5 evaluation metrics ». In : *Fifth Message Understanding Conference (MUC-5) : Proceedings of a Conference Held in Baltimore, Maryland, August 25-27, 1993*. 1993.
- [228] Sinno Jialin PAN et Qiang YANG. « A survey on transfer learning ». In : *IEEE Transactions on knowledge and data engineering* 22.10 (2009), p. 1345-1359.
- [229] Jarno DROST et Hans CLEVERS. « Organoids in cancer research ». In : *Nature Reviews Cancer* 18.7 (2018), p. 407-418.
- [230] Devanjali DUTTA, Inha HEO et Hans CLEVERS. « Disease modeling in stem cell-derived 3D organoid systems ». In : *Trends in molecular medicine* 23.5 (2017), p. 393-410.
- [231] Hei Ming LAI, Alan King Lun LIU, Harry Ho Man NG, Marc H GOLDFINGER, Tsz Wing CHAU, John DEFELICE, Bension S TILLEY, Wai Man WONG, Wutian WU et Steve M GENTLEMAN. « Next generation histology methods for three-dimensional imaging of fresh and archival human brain tissues ». In : *Nature communications* 9.1 (2018), p. 1-12.

- [232] Weizhe LI, Ronald N GERMAIN et Michael Y GERNER. « Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (Ce3D) ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.35 (2017), E7321-E7330.
- [233] Jingtian ZHU, Tingting YU, Yusha LI, Jianyi XU, Yisong QI, Yingtao YAO, Yilin MA, Peng WAN, Zhilong CHEN, Xiangning LI et al. « MACS : Rapid Aqueous Clearing System for 3D Mapping of Intact Organs ». In : *Advanced Science* 7.8 (2020), p. 1903185.
- [234] Reka HOLLANDI, Abel SZKALISITY, Timea TOTH, Ervin TASNADI, Csaba MOLNAR, Botond MATHE, Istvan GREXA, JOZSEF MOLNAR, Arpad BALIND, Mate GORBE et al. « nucleAIzer : A parameter-free deep learning framework for nucleus segmentation using image style transfer ». In : *Cell Systems* (2020).
- [235] Hyungjoo CHO, Sungbin LIM, Gunho CHOI et Hyunseok MIN. « Neural stain-style transfer learning using gan for histopathological images ». In : *arXiv preprint arXiv :1710.08543* (2017).
- [236] Christopher M BISHOP. *Pattern recognition and machine learning*. springer, 2006.
- [237] Tristan GLATARD, Carole LARTIZIEN, Bernard GIBAUD, Rafael Ferreira DA SILVA, Germain FORESTIER, Frédéric CERVENANSKY, Martino ALESSANDRINI, Hugues BENOIT-CATTIN, Olivier BERNARD, Sorina CAMARASU-POP et al. « A virtual imaging platform for multi-modality medical image simulation ». In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 32.1 (2012), p. 110-118.
- [238] Serge DMITRIEFF et François NÉDÉLEC. « ConfocalGN : A minimalistic confocal image generator ». In : *SoftwareX* 6 (2017), p. 243-247.
- [239] Michael J NASSE et Jörg C WOHL. « Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy ». In : *Josa a* 27.2 (2010), p. 295-302.
- [240] Arik GIRSAULT, Tomas LUKES, Azat SHARIPOV, Stefan GEISSBUEHLER, Marcel LEUTENEGGER, Wim VANDENBERG, Peter DEDECKER, Johan HOFKENS et Theo LASSER. « SOFI simulation tool : a software package for simulating and testing super-resolution optical fluctuation imaging ». In : *PLoS One* 11.9 (2016), e0161602.
- [241] Martin WEIGERT, Kaushikaram SUBRAMANIAN, Sebastian T BUNDSCHUH, Eugene W MYERS et Moritz KREYSING. « Biobeam—Multiplexed wave-optical simulations of light-sheet microscopy ». In : *PLoS computational biology* 14.4 (2018), e1006079.



FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : AHMAD

DATE de SOUTENANCE : 23/09/2021

Prénoms : Ali

TITRE : Simulation et apprentissage machine pour l'analyse d'images de cellules uniques basée sur la microscopie à fluorescence en microfluidique

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2021LYSEI057

Ecole doctorale : Électronique, Electrotechnique et Automatique

Spécialité : Traitement du signal et de l'image

RESUME : Cette thèse se situe dans le contexte de l'étude des cellules isolées, i.e. la cytologie. Cette branche de l'analyse du vivant est en pleine évolution grâce à des apports technologiques révolutionnaires. Ainsi, grâce à la microfluidique, les cellules peuvent désormais être amenées automatiquement sous un microscope. Par ailleurs, grâce aux études sur les organoïdes et la transpiration des tissus il est possible d'observer *in situ* les caractéristiques individuelles des cellules dans des agrégats en 3D. La puissance de ces évolutions technologiques en cytologie est possiblement décuplée quand elles sont associées à la diversité de modalités de microscopies à fluorescence ou encore à l'apprentissage machine.

Ces nouvelles opportunités en cytologie moderne amènent également un lot de questions ouvertes : Quel microscope choisir ? Quelle résolution ? Comment accélérer le débit de l'imagerie sans augmenter le coût de l'expérimentation ?

La réponse à ces questions dépend bien sûr de la question biologique posée mais la méthodologie pour y répondre peut-être générique. Nous les abordons avec une approche originale de simulation numérique en montrant l'apport de la simulation pour de l'instrumentation virtuelle et pour de l'augmentation de données en apprentissage machine.

Sur cellules uniques, nous montrons que lorsqu'une tâche de tri est seulement visée, il est possible de recourir à la microscopie 2D sous-résolue ou à l'imagerie diffractive en utilisant des caractéristiques texturales. Aussi, nous montrons que l'effet de flou apporté par la microfluidique peut être négligeable. Sur agrégats cellulaires, la détection individuelle de cellules est fortement dépendante de la qualité des images acquises. Un facteur important permettant d'avoir des images de haute qualité est la clarification chimique des échantillons. Néanmoins, ces méthodes sont invasives et coûteuses. Dans une deuxième partie de la thèse, nous montrons la puissance de l'apprentissage profond pour réaliser une clarification numérique des échantillons par apprentissage de type transfert.

MOTS-CLÉS : Microscopie à fluorescence, Système microfluidique, Cellule unique, tri des cellules, Simulation des images microscopiques, apprentissage automatique, Instrumentation virtuelle, Sphéroïde, clarification numérique.

Laboratoire (s) de recherche :

Centre de recherche en acquisition et traitement de l'image pour la santé (CREATIS), Lyon
Laboratoires angevins de recherche en ingénierie des systèmes (LARIS), Angers

Directeur de thèse : M. David SARRUT

Président de jury : Mme PEYRIN Françoise

Composition du jury :

PEYRIN, Françoise	DR-HDR	ESRF-INSA Lyon	Examinatrice
LORENZO, Corinne	IR-HDR	Université de Toulouse	Rapporteuse
ZIMMER, Christophe	DR-HDR	Institut Pasteur	Rapporteur
WEIGERT, Martin	MCF	EPFL Lausanne	Examinateur
SARRU, David	DR	CNRS Lyon	Directeur de thèse
ROUSSEAU, David	PU	Université d'Angers	Co-directeur de thèse
FRINDEL, Carole	MCF- HDR	INSA Lyon	Encadrante