

# Acquisition et recalage informatique d'images confocales de tissus denses - Application à l'étude de la papille folliculaire de vibrisse de souris

THÈSE N° 4105 (2008)

PRÉSENTÉE LE 20 JUIN 2008

À LA FACULTE SCIENCES DE LA VIE  
LABORATOIRE DE DYNAMIQUE DES CELLULES SOUCHES (SV/STI)  
PROGRAMME DOCTORAL EN NEUROSCIENCES

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Nicolas FÊTE

ingénieur informaticien diplômé EPF  
de nationalité suisse et originaire de Cortébert (BE)

acceptée sur proposition du jury:

Prof. W. Pralong, président du jury  
Prof. Y. Barrandon, Prof. J.-Ph. Thiran, directeurs de thèse  
Prof. G. Abou Jaoudé, rapporteur  
Dr M. Bach Cuadra, rapporteur  
Prof. J.-F. Nicolas, rapporteur



ÉCOLE POLYTECHNIQUE  
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

Suisse  
2008



## Version abrégée

L'analyse de la structure en 3D d'un échantillon biologique est une étape importante pour la modélisation de la dynamique cellulaire et tissulaire. Nous avons mis au point une méthode pour déterminer le nombre de noyaux d'une papille folliculaire (notre modèle expérimental) en utilisant la microscopie confocale et des techniques informatiques afin d'obtenir une reconstruction en 3D de cet échantillon. La papille folliculaire est une petite structure de forme ovale située à la base du follicule pileux. Elle joue un rôle primordial lors de la morphogénèse du follicule pileux ainsi que lors du cycle pileux où sa taille varie au cours des différentes phases du cycle. Cependant, l'influence du cycle pileux sur le nombre de cellules de la papille folliculaire est encore peu connue. Les souris *Fgf5* *-/-* ont des poils plus longs que la normale (phénotype angora) dû à une augmentation du cycle pileux, mais ont aussi des papilles folliculaires plus petites. Cette dernière observation sur la taille des papilles folliculaires *Fgf5* *-/-* peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

1. Il y a moins de cellules dans les papilles folliculaires *Fgf5* *-/-* que dans celles des souris sauvages
2. Les cellules des papilles folliculaires *Fgf5* *-/-* produisent moins de matrice extracellulaire que celles des papilles folliculaires sauvages
3. Une combinaison des deux hypothèses citées précédemment

Afin de départager ces différentes hypothèses, des papilles folliculaires ont été microdisséquées à partir de follicules de vibrisse situés au même endroit sur le museau de l'animal et au même âge sur des souris *Fgf5* *-/-* et sauvages. Les noyaux ont été marqués à l'aide d'un marqueur nucléaire fluorescent, puis les papilles ont été examinées sous un microscope confocal. Du fait de l'épaisseur des papilles folliculaires, deux piles d'images ont été acquises pour chaque échantillon (acquisitions *recto* et *verso*), recalées avec un programme informatique spécialement implémenté dans ce but, puis analysées. Ce processus entier s'est avéré bien plus complexe et plus long que nous l'avions anticipé. Premièrement, nous avons dû créer un montage spécial permettant une acquisition *recto-verso*, deuxièmement le temps d'acquisition pour obtenir deux piles d'images couvrant la totalité du volume de la papille folliculaire s'est avéré très long, et troisièmement les processus de recalage et d'analyse se sont révélés complexes. Malgré cela, le nombre de noyaux de plusieurs papilles folliculaires a pu être déterminé avec précision. L'analyse des papilles folliculaires prélevées à différents points du cycle pileux est en cours. Ce travail de thèse ouvre la voie à l'analyse d'autres structures biologiques importantes pendant la morphogénèse de la peau ou de sa régénération (par exemple : les placodes ectodermiques). Une leçon importante découlant de ce travail est qu'il n'y a pas de techniques faciles et rapides d'imagerie et d'informatique lorsque l'on veut étudier des structures biologiques complexes, et qu'il est donc nécessaire que ces technologies soient adaptées ou modifiées pour chaque nouvelle question biologique.

### Mots-clés :

follicule pileux, anagène, catagène, dénombrement, noyaux, papille folliculaire, recalage d'images, microscopie confocale, acquisition recto verso



# Abstract

Analysis of the 3D structure of a biological sample is an important step to model cell and tissue dynamics. As a model system, we set up to determine the number of nuclei in a follicular papilla using confocal imaging and 3D computer reconstruction. The follicular papilla is a small mesenchymal oval-shape structure localized at the basis of the hair follicle that is particularly important for hair follicle morphogenesis, and the size of which varies during hair growth. However, little is known on the influence of the hair cycle on the number of cells in a follicular papilla. *Fgf5*  $-/-$  mice have long hairs (angora phenotype) due to an extended hair cycle, and small dermal papilla. There are several hypotheses to explain the latter observation :

1. there are less cells in *Fgf5*  $-/-$  dermal papilla than in wild type papilla
2. mutant papilla produces less extra cellular matrix than wild type papilla
3. it is a combination of both

To discriminate between these hypotheses, dermal papilla were microdissected from vibrissal follicles occupying the same position on the mystacial pad of same age *Fgf5*  $-/-$  and wild type mice. Nuclei were stained with a fluorescent dye and the papilla examined under a confocal microscope. Because of dermal papilla tickness, two stacks of images were acquired for each sample (*recto* and *verso* acquisitions), registrated using especially implemented computer science program and analyzed. This whole process turned out to be far more complex and cumbersome than anticipated. First, we had to design a special setup in order to be able to make two side scans of samples, second the acquisition time of two stacks of images to cover the entire dermal papilla was rather long, third repositioning and analysis of the images were complex. Nonetheless, the number of nuclei in a dermal papilla was determined with precision. Analysis of dermal papilla obtained at different time of the hair cycle is ongoing. Our work paves the way to the analysis of other biological structures important during skin morphogenesis or regeneration, i.e. the ectodermal placodes. An important lesson of our work is that there is no straightforward imaging and computer science approach when it comes to the biology of complex structures and that the technology needs to be customized to the biological question.

**Keywords :**

hair follicle, anagen, catagen, nuclei, counting, dermal papilla, image registration, confocal microscopy, two side scan



# Remerciements

LA Nature n'utilise que les plus longs fils pour tisser ses motifs, de sorte que la plus petite pièce révèle la structure de la tapisserie toute entière...

Richard Phillips FEYNMAN

Le meilleur ami de « merci » est « beaucoup ». Citation de *Michel Bouthot*, un écrivain québécois. Simple mais qui résume parfaitement mes pensées, qui vont à l'ensemble des personnes qui, de près ou de loin, m'ont guidé, conseillé, soutenu et encouragé tout au long de cette aventure doctorale.

Mes premiers remerciements iront à mon premier co-directeur de thèse, le Prof. Yann Barrandon, qui m'a offert l'opportunité de pouvoir plonger dans ce monde passionnant qu'est la biologie, en m'accueillant au sein de son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir ouvert les portes d'un domaine dont la complexité n'en finit pas de me fasciner et d'avoir cru en mes capacités à m'adapter à ce nouveau domaine, malgré mon lourd handicap que représente ma formation d'ingénieur en Informatique!! :)

Je voudrais ensuite témoigner de ma profonde gratitude envers mon deuxième co-directeur de thèse, le Prof. Jean-Philippe Thiran, pour m'avoir initié et guidé dans ce domaine de l'informatique qui m'était étranger, à savoir le traitement d'images et plus particulièrement, le recalage d'images. Je voudrais le remercier d'avoir toujours été présent pour m'orienter de la meilleure manière qui soit malgré les difficultés rencontrées et de m'avoir transmis son souci d'exactitude au niveau de mon travail.

Mes remerciements s'adressent également au Prof. William Pralong, pour sa sollicitude, en assurant sans réserve et au pied levé la direction de mon jury de thèse, ainsi qu'aux rapporteurs, qui ont lu et approuvé mon travail : le Prof. Jean-François Nicolas, de l'Institut Pasteur à Paris, le Prof. Georges Abou-Jaoudé, de la Faculté ENAC de l'EPFL, et la Dr. Meritxell Bach Cuadra, du Centre d'Imagerie Biomedicale du CHUV. J'ai particulièrement apprécié la discussion passionnée que j'ai eu avec eux lors de ma défense, j'en garderai un excellent souvenir : je ne pense pas que beaucoup de jury soit capable de faire rire aux éclats le candidat à la thèse!

Viennent ensuite les personnes qui occupent une place importante dans la partie expérimentale de mon travail. Tout d'abord, je voudrais remercier vivement Jeanne et Steeve, pour m'avoir initié aux joies de l'expérimentation biologique en laboratoire : « faire comme les biologistes » peut s'avérer amusant pour quelqu'un qui n'est pas du domaine, mais le faire bien nécessite d'être bien encadré. En cela, c'est très agréable de pouvoir compter sur des personnes compétentes. Ensuite, Antoine Gagliardi, de l'atelier maquette de la Faculté ENAC : sans lui, je n'aurais pu mettre au point mon petit montage pour la microscopie. C'est toujours avec plaisir que je retourne dans son atelier, ne serait-ce que pour voir les dernières magnifiques maquettes en bois ou carton construites par lui et son équipe. Enfin, toutes les personnes de la plateforme d'imagerie de la Faculté de Sciences de la Vie, à savoir la Dr. Nathalie Garin, Juan-Carlos Sarria « Floyd », Thierry Laroche et José Artacho. J'ai énormément appris grâce à eux et je leur en suis extrêmement reconnaissant. Leurs compétences, leur passion, et leur sollicitude (mille fois merci Thierry) font que cela a été un réel plaisir de travailler et apprendre avec eux!

Je n'aurais pu réussir sans un bon encadrement scientifique. En cela, je voudrais remercier dans leur ensemble toutes les personnes du laboratoire qui ont toujours été à disposition pour répondre à mes multiples questions biologiques, même quand vous aviez peu de temps. En particulier, Mike, Daniel et Christelle, pour le « brainstorming » pré-défense, et bien entendu, Alexandra D., pour l'aide précieuse qu'elle m'a apporté lors de mes expériences, son soutien tout au long de ma thèse et ses corrections lors de la rédaction.

Mes pensées vont naturellement à ma famille, qui bien qu'à une certaine distance, m'ont constamment soutenu en pensées. Je saisis l'occasion pour remercier mon frère, dont la vérification de l'exactitude de mes affirmations mathématiques ont contribué à mon travail, et également mon cher père, à qui je dédie ce travail, car ayant choisi son travail de médecin par vocation, il a été ma première initiation au monde médical et biologique.

Finalement, un merci tout particulier à Céline, dont la curiosité d'esprit, le soutien et les encouragements ont été autant de vitamines bénéfiques à mon travail de thèse.



# Table des matières

<b>Version abrégée</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Remerciements</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières</b>	<b>vii</b>
<b>1 Introduction biologique</b>	<b>1</b>
1.1 Modèle expérimental : les follicules de vibrisse de souris	1
1.2 Structure du follicule de vibrisse	1
1.3 Cycle pileux	4
<b>2 Question biologique</b>	<b>7</b>
2.1 Présentation de la problématique	7
2.2 Récapitulatif des résultats biologiques	8
2.2.1 Motif d'expression de <i>Fgf5</i>	8
2.2.2 Augmentation de la durée de la phase anagène	9
2.2.3 Dimensions pileux	10
2.2.4 Diminution du nombre de cellules dans le cortex	11
2.2.5 Modification du diamètre de la papille	11
<b>3 Concepts technologiques</b>	<b>13</b>
3.1 Microscopie confocale	13
3.1.1 Notions spécifiques	15
3.2 Recalage informatique	15
<b>4 Matériel et méthode</b>	<b>19</b>
4.1 Extraction de la papille folliculaire	19
4.2 Fixation et marquage	19
4.3 Montage	20
4.4 Microscopie confocale	20
4.5 Déconvolution	21
4.6 Recalage	22
4.6.1 Sélection des images des sous-volumes	22
4.6.2 Exécution du recalage	22
4.6.3 Fusion des images	23
4.7 Comptage	25

<b>5 Développement méthodologique</b>	<b>27</b>
5.1 Obtention et filtrage de l'information . . . . .	27
5.1.1 Constitution d'un volume de noyaux . . . . .	27
5.1.2 Marquage spécifique . . . . .	28
5.1.3 Densité cellulaire dans la région bulbaire . . . . .	29
5.1.4 Limitation de la profondeur d'acquisition . . . . .	30
5.1.5 Amélioration de la qualité d'acquisition . . . . .	33
5.1.6 Durée d'acquisition . . . . .	44
5.2 Traitement de l'information . . . . .	46
5.2.1 Déconvolution . . . . .	46
5.2.2 Recalage des volumes d'images . . . . .	48
5.2.3 Reconnaissance et comptage des noyaux . . . . .	57
<b>6 Résultats</b>	<b>59</b>
6.1 Validation de la méthode . . . . .	59
6.1.1 Acquisition et déconvolution . . . . .	60
6.1.2 Recalage . . . . .	62
6.1.3 Comptage nucléaire . . . . .	69
6.2 Application à la question biologique . . . . .	71
6.2.1 Comptage final . . . . .	71
<b>7 Perspectives et conclusions</b>	<b>77</b>
<b>Liste des illustrations</b>	<b>81</b>
<b>Liste des tables</b>	<b>83</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>85</b>
Biologie . . . . .	85
Microscopie . . . . .	86
Informatique . . . . .	86

# 1

## Introduction biologique

### 1.1 Modèle expérimental : les follicules de vibrisse de souris

Les follicules de vibrisse sont des structures très spécialisées qui produisent les « moustaches ». Les vibrisses sont des poils ayant une fonction tactile indispensable pour l'animal. Elles sont localisées sur le museau des animaux et sont absentes chez l'homme. Les follicules de vibrisse sont disposés dans un ordre précis au niveau de la lèvre supérieure de l'animal. La nomenclature de référence pour la disposition des vibrisses est celle d'Oliver [12] et sera utilisée lors de ce travail (c.f. figure 1.1, page 2)

Chez la souris, les follicules de vibrisse sont organisés en 5 rangées horizontales. Les follicules d'une même colonne ont approximativement la même longueur. Par contre, ils augmentent en taille selon un axe antéro-postérieur. D'un point de vue expérimental, cet arrangement est un avantage car il permet de travailler sur la même vibrisse en évitant ainsi toutes variations liées à la taille du follicule. Les papilles utilisées pour les expériences de comptage de noyaux sont celles des vibrisses  $a_3$  et  $a_4$  (c.f. 'Application à la question biologique', page 71), et celles pour la validation proviennent de vibrisses de la rangée  $e$  (c.f. 'Validation de la méthode', page 59).

### 1.2 Structure du follicule de vibrisse

Les follicules de vibrisse sont des annexes épidermiques au même titre que les follicules du pelage, les glandes sébacées, les glandes sudoripares et les griffes. Ils sont en contact avec l'épiderme dont ils dérivent embryologiquement et sont logés dans le derme et l'hypoderme. Ces structures ont un aspect histologique particulier et un fonctionnement biologique qui leur est propre (renouvellement, maturation, réponse à des stimuli extérieurs...)

La structure histologique des follicules de vibrisse est complexe et comprend :

- une partie épithéliale composée de la gaine épithéliale externe (GEE), de la gaine épithéliale interne (GEI), de la tige pileaire et de la matrice
- une partie dermique constituée de la papille folliculaire, de la gaine mésenchymateuse, de la capsule et d'une structure annulaire, le « ringwulst » (c.f. figure 1.2, page 3)

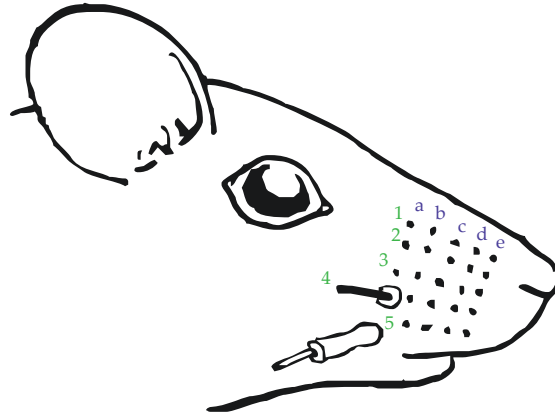


FIGURE 1.1 – **Arrangement des follicules de vibrisse sur le museau (Oliver, 1966)**

Les lettres indiquent les rangées verticales selon l'axe postéro-anérieur. Les chiffres indiquent les rangées horizontales selon l'axe dorso-ventral. La rangée *a* contient 4 vibrisses, les autres rangées 5. *Illustration originale : R.Kirstic*

La GEE est un prolongement de l'épiderme interfolliculaire. Elle contient plusieurs couches cellulaires : la couche basale, la couche spineuse et la couche granuleuse dite « couche des cellules compagnes ». Dans le tiers supérieur du follicule, la GEE s'élargit pour former une structure nommée le renflement (ou *bulge*, en anglais).

La GEI, située entre la GEE et la tige pilaire, est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, de la couche de Henlé, de la couche de Huxley et de la cuticule. La tige pilaire ou poil est quant à elle, composée de trois couches cellulaires, à savoir, toujours de l'extérieur vers l'intérieur, la cuticule, le cortex et la médulla.

La partie inférieure du follicule de vibrisse s'élargit pour former le bulbe. Il contient la papille folliculaire et la matrice. La matrice, composée uniquement de cellules épithéliales, entoure la papille folliculaire. La région matricielle est le siège d'une forte prolifération cellulaire, à l'origine des cellules différenciées formant les trois couches de la GEI et les trois couches de la tige pilaire. La jonction entre la papille folliculaire et le feuillet mésenchymateux s'appelle le pédoncule basal (ou « basal stalk »).

La partie dermique (gaine mésenchymateuse et papille folliculaire) entoure la partie épithéliale du follicule, ces deux zones étant séparées par une lame basale.

La papille folliculaire est formée de fibroblastes<sup>1</sup> à faible activité mitotique<sup>2</sup> *in vivo* et de matrice extracellulaire. Elle est vascularisée dans le follicule de vibrisse et avasculaire dans les follicules de pelage de la souris et du rat. Elle joue enfin un rôle fondamental dans la mise en place du follicule pileux, ainsi que dans son cycle pileux [11, 17, 18]. Elle serait le siège d'importants échanges de signaux moléculaires avec les cellules épithéliales de la matrice.

Une des particularités du follicule de vibrisse est qu'il est entouré par une capsule souple et résistante d'origine mésenchymateuse qui contient deux sinus veineux permettant une vascularisation riche du follicule. De plus, il ne possède pas de muscle arrecteur du poil comme pour les follicules du pelage, mais de larges fibres musculaires qui s'insèrent au niveau de la capsule [1]. Une autre particularité du follicule de vibrisse est qu'il reçoit une innervation sensorielle provenant de la branche infraorbitale du nerf trijumeau [3]. Le nerf principal pénètre dans la capsule au niveau de la moitié inférieure du follicule et distribue ses terminaisons nerveuses vers différentes régions du follicule, dont le renflement [19].

1. Cellules fusiformes, ayant un noyau oval, présentes dans les tissus conjonctifs (tissu lâche). Elles ont une activité sécrétrice importante, à l'origine de la matrice extracellulaire

2. Activité de division cellulaire

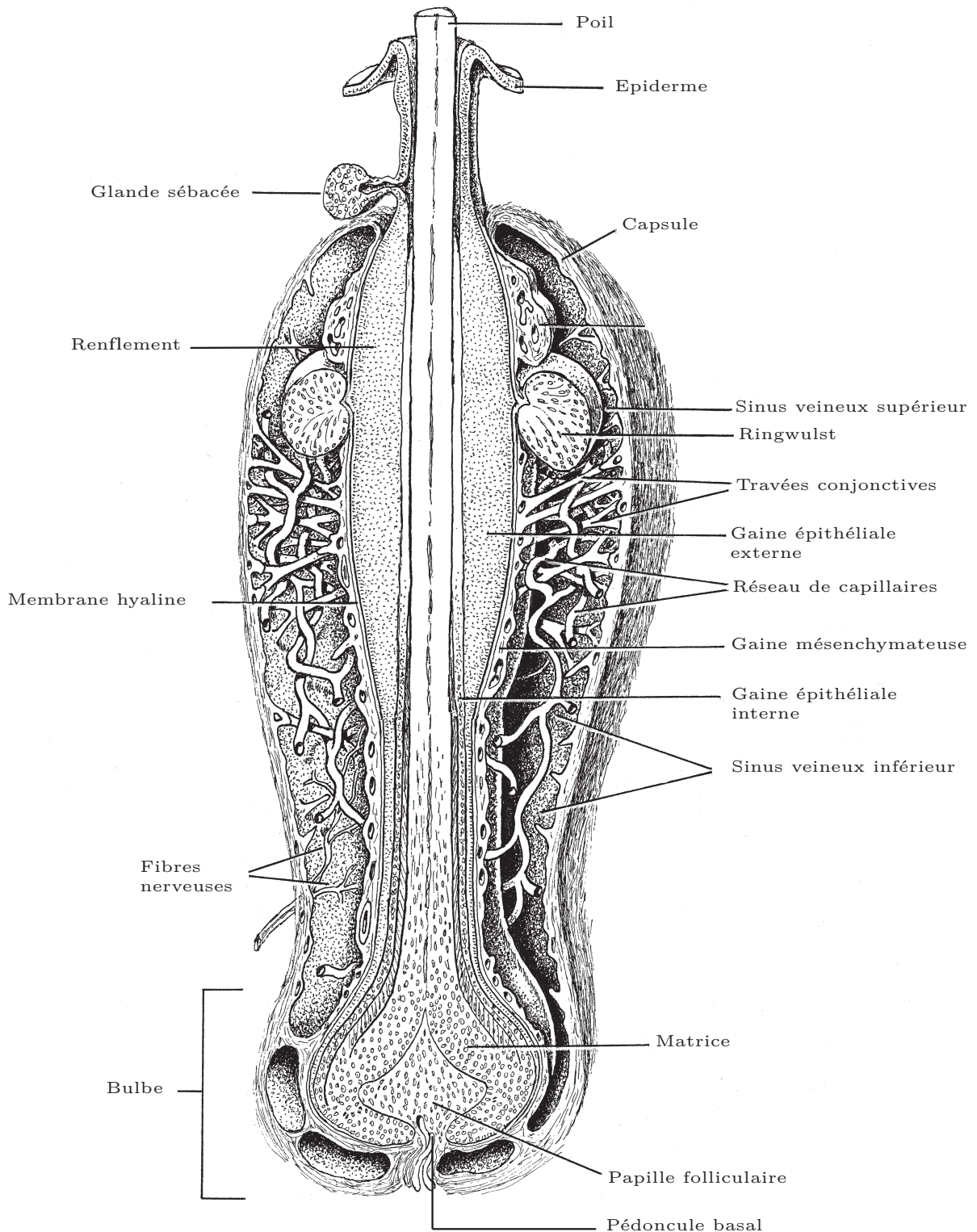


FIGURE 1.2 – Le follicule pileux *Illustration : R.Kirstic*

### 1.3 Cycle pilaire

Les vibrisses, comme les follicules du pelage, subissent des modifications cycliques qui permettent leur renouvellement tout au long de la vie de l'animal. Le cycle pilaire est normalement composé de trois phases : la phase anagène, la phase catagène et la phase télogène [4] (c.f. figure 1.3, page 5). La phase anagène est une phase de croissance où la tige pilaire et la GEI sont produites. Cette phase est caractérisée par une intense multiplication des cellules épithéliales situées dans la matrice. La croissance du poil résulte de la différenciation des cellules produites dans la matrice. Cette phase est suivie de la phase catagène, pendant laquelle d'importants remaniements se produisent. Ils débutent par l'arrêt de l'activité mitotique matricielle, suivi de l'arrêt de la croissance pilaire et de la régression de la partie inférieure du follicule. A la base du poil, se forme un club kératinisé, en dessous duquel se trouve un cordon constitué de cellules résiduelles du bulbe et de la GEE. La papille folliculaire, rétractée et quiescente, se trouve à l'extrémité de ce cordon. Par la suite, la majorité des cellules épithéliales du cordon dégénèrent et la papille folliculaire se positionne sous le club. Les cellules épithéliales restant sous ce dernier forment le « germe ». C'est la phase télogène, ou phase de repos. Durant cette période, le follicule a une longueur réduite au tiers de sa longueur en phase anagène. Puis, une nouvelle phase anagène est initiée et un nouveau poil est produit.

Cependant, cette classification des différents stades du cycle pilaire ne s'applique qu'aux follicules du pelage et non à ceux des vibrisses. En effet, il n'y a pratiquement pas de régression de la partie inférieure du follicule de vibrisse et pas de phase télogène. Dans notre laboratoire, des vibrisses de rat ont été microdisséquées, observées sous une loupe binoculaire et coupées au cryostat afin d'en déterminer les différentes phases du cycle du follicule de vibrisse (c.f. figure 1.4, page 5).

En anagène, le follicule de vibrisse possède un bulbe en forme d'oignon contenant une papille folliculaire proéminente. Sous la loupe binoculaire, la partie inférieure de la tige pilaire apparaît comme une zone sombre qui correspond à la région non mature du poil. A ce stade, les cellules en prolifération sont situées dans la matrice près de la papille folliculaire. Peu de mitoses sont retrouvées dans la région reliant le bulbe au renflement.

En anagène tardive, les follicules ont un bulbe moins proéminent et une papille folliculaire plus petite et allongée. Au fur et à mesure que le cycle progresse, la taille du follicule diminue légèrement en longueur et en largeur et la papille folliculaire devient de plus en plus petite. La zone sombre de la tige pilaire commence à diminuer due à la différenciation du poil. Cette diminution est accompagnée par la formation d'un club kératinisé à l'extrémité inférieure de la tige pilaire. A ce stade, l'activité mitotique dans le bulbe est très réduite et la production du poil s'est arrêtée. La zone sombre de la tige pilaire continue à diminuer en même temps que le club remonte vers la partie supérieure du follicule. C'est la phase catagène.

Une nouvelle phase anagène est alors initiée sans délai, accompagnée par une augmentation en taille de la papille folliculaire et par l'apparition d'un nouveau cône de croissance. Lors de la progression de la phase anagène, la taille de la papille folliculaire augmente rapidement et une fine tige pilaire est identifiable du côté opposé au club. Puis, la tige pilaire franchit la surface de l'épiderme alors que l'ancien poil est encore ancré dans la partie supérieure du follicule. L'ancien poil restera encore en place pendant quatre semaines avant de tomber.

Ces expériences [13] confirment que les différentes phases du cycle pilaire du follicule de vibrisse ne sont pas aussi bien séparées et définies que celle du follicule du pelage. En effet, une nouvelle phase anagène est rapidement initiée sans passer par la phase de repos, la phase télogène.

La régulation précise du cycle pilaire implique donc des horloges biologiques, dont la nature exacte est encore mal connue. Cependant, il est vraisemblable que certains de ces phénomènes cellulaires et moléculaires sont la répétition d'événements morphogénétiques intervenant lors du développement embryonnaire [11]. La papille folliculaire semble également jouer un rôle important dans le contrôle du cycle pilaire [17, 15].

Ce chapitre a été revu et corrigé par ma post-doc attirée d'après sa thèse [2].

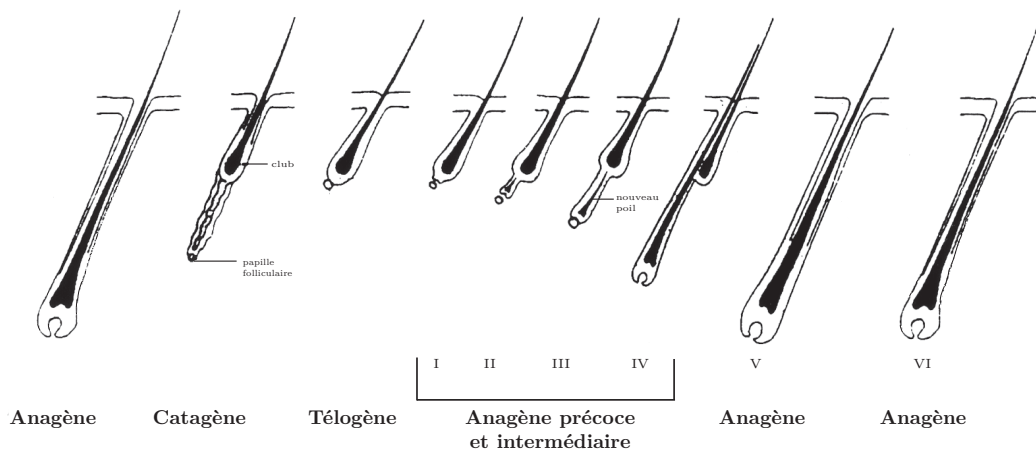


FIGURE 1.3 – Cycle pilaire des follicules de pelage *D'après Randall et al.,1993*

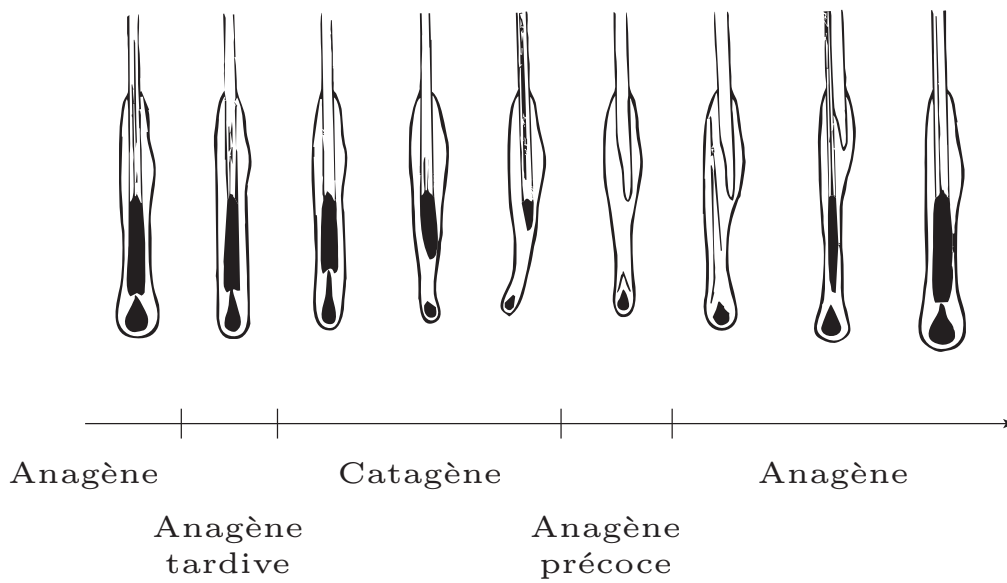


FIGURE 1.4 – Cycle pilaire des follicules de vibrisse *D'après Oshima et al.,2001*





# 2

## Question biologique

La question biologique à laquelle répond le travail de cette thèse découle de résultats obtenus précédemment dans le laboratoire [9]. Ces travaux ont porté sur l'étude de l'influence du facteur de croissance fibroblastique FGF5 sur le cycle pilaire du follicule de vibrisse chez une lignée de souris dont le gène *Fgf5* a été inactivé par l'insertion en phase du gène *LacZ* (Georgios Tzimagiorgis-Max Planck Institute for Neurology). La mutation de ce gène a été identifiée comme étant responsable du phénotype angora chez la souris [6] (c.f. figure 2.1, page 7).



**FIGURE 2.1 – Souris sauvage et souris homozygote, fond B6D2**

Les souris homozygotes *Fgf5*  $-/-$  sont facilement reconnaissable dû au phénotype angora « poils longs » des souris hétérozygotes *Fgf5*  $+/-$  ou sauvages , à « poils courts ». A noter que pour départager ces deux dernières, un génotypage par PCR est nécessaire. *Photo : C.Kedzia,1998*

### 2.1 Présentation de la problématique

L'étude de l'influence de FGF5 sur le cycle pilaire du follicule de vibrisse chez la souris a abouti à plusieurs résultats :

1. En l'absence de FGF5, la phase anagène du cycle pileux est plus longue
2. FGF5 n'est pas indispensable pour l'initiation de la phase catagène
3. Les poils des souris *Fgf5*  $-/-$  sont plus longs que ceux des souris sauvages et ont moins de cellules corticales
4. L'initiation de la phase catagène pourrait être corrélée avec le diamètre du poil
5. Le diamètre des papilles folliculaires des follicules de vibrisse *Fgf5*  $-/-$  est plus petit que celui des vibrisses *Fgf5*  $+/-$  lorsqu'on les compare à un même instant  $t$

De ce dernier point découle la question biologique de ce travail de thèse, à savoir :

« POURQUOI LES PAPILLES FOLLICULAIRES DES SOURIS *Fgf5*  $-/-$  SONT-ELLES PLUS PETITES QUE LEUR HOMOLOGUE CHEZ DES SOURIS SAUVAGES ? »

Trois hypothèses sont avancées :

1. soit les cellules de la papille folliculaire produisent moins de matrice extracellulaire ce qui engendrerait une diminution du volume de la papille
2. soit les papilles *Fgf5*  $-/-$  contiennent moins de cellules ce qui impliquerait une diminution de production de matrice extracellulaire et donc une diminution du volume de la papille
3. soit c'est une combinaison des deux hypothèses citées ci-dessus

Un nombre constant de cellules impliquerait le rejet de la première hypothèse en faveur de la seconde. Le dénombrement nucléaire au niveau de la papille folliculaire semble donc le meilleur moyen d'y parvenir. Pour effectuer ce comptage de noyaux de la papille folliculaire, une méthode complexe impliquant trois domaines différents a été développée (c.f. chapitre 'Développement méthodologique', page 27) : la biologie du follicule de vibrisse et de son cycle pileux, la microscopie confocale et le traitement d'images et plus particulièrement le recalage de volumes d'images.

## 2.2 Récapitulatif des résultats biologiques

Pour la compréhension des fondements de cette question, un rappel des résultats extraits de la thèse de Cécile Kedzia, effectuée dans le laboratoire en 1998 à Paris. Ces résultats sont à dissocier du travail effectué pendant cette présente thèse.

### 2.2.1 Motif d'expression de *Fgf5*

L'expression du gène *Fgf5* a pu être étudiée grâce à l'insertion du gène *LacZ* inséré en phase dans le gène *Fgf5* endogène, provoquant par la même occasion son inactivation. L'étude du motif d'expression de *Fgf5* peut donc être révélée par une réaction enzymatique (coloration X-Gal) mettant en évidence la présence de la bêta-galactosidase (produit du gène *LacZ*) dans les cellules où le promoteur du gène *Fgf5* est actif. La concordance entre l'expression du gène *LacZ* chez les souris hétérozygotes *Fgf5*  $+/-$  et du gène *Fgf5* endogène chez les souris sauvages a été confirmée par hybridation *in situ* avec une sonde spécifique pour l'ARNm de *Fgf5*. La présence de la bêta-galactosidase a donc été considérée comme le résultat de l'expression du gène *Fgf5*.

L'expression de *Fgf5* varie de façon spatio-temporelle dans le follicule de vibrisse au cours du temps. Elle commence tout d'abord à  $P_2$  dans la région suprabulbaire dans la GEE (c.f. figure 2.2(a), page 9), pour s'étendre progressivement, bi-directionnellement, vers la base du follicule et la partie intermédiaire du follicule de vibrisse ( $P_8$ ) (c.f. figure 2.2(b), page 9).

Sur des coupes longitudinales histologiques de vibrisse *Fgf5*  $+/-$  et  $-/-$ , les cellules positives pour l'activité de la bêta-galactosidase (c.f. figure 2.3, page 10) ont été observées uniquement dans la GEE.

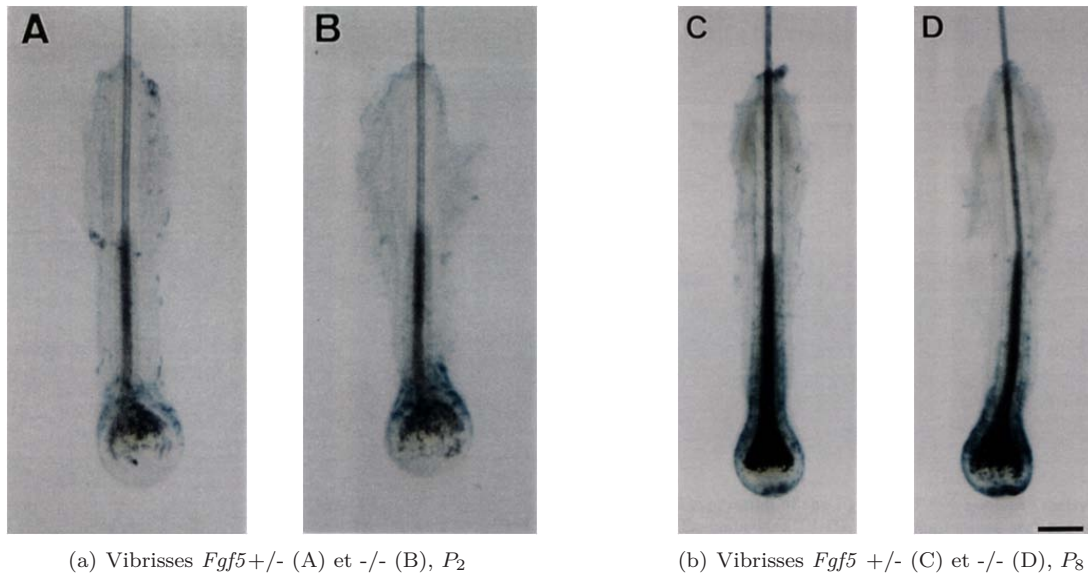


FIGURE 2.2 – Motif d'expression temporelle de *Fgf5*

Follicule de vibrisse a3 de souris *Fgf5* +/- (A et C) et *Fgf5* -/- (B et D) où l'expression de la bêta-galactosidase a été mise en évidence par une réaction enzymatique. Le motif d'expression de *Fgf5* est identique chez les souris hétérozygotes et homozygotes mais varie au cours du temps ( (a) :  $P_2$  ; (b) :  $P_8$ ). L'expression de *Fgf5* débute dans la région suprabulbaire de la GEE (a) et s'étend vers la base du bulbe mais aussi vers la partie intermédiaire du follicule (b). A noter que l'expression de *Fgf5* ne semble pas homogène dans la GEE mais très prononcée dans la région située à la base du bulbe. Echelle : 180  $\mu\text{m}$ .

La matrice, la GEI, la papille folliculaire et la gaine mésenchymateuse par contre en sont exemptes. Ces cellules se situent à  $P_2$  dans la région suprabulbaire où les trois couches de la GEE se rejoignent pour n'en former qu'une seule (c.f. figures 2.3(a) et 2.3(b), page 10).

A  $P_{10}$ , des cellules bêta-galactosidase positives sont retrouvées un peu plus haut, dans la partie intermédiaire du follicule, au fur et à mesure de la progression de la phase anagène. Ces cellules sont cependant seulement localisées dans la couche des cellules compagnes, i.e. la couche la plus interne de la GEE, adjacente à la GEI (c.f. figure 2.3(d), page 10). D'autres cellules positives sont aussi localisées plus bas, dans la partie la plus extrême du bulbe, dans la région des « cornes » (c.f. figure 2.3(c), page 10). On constate par ailleurs en 3D que cette région exprimant en tant normal *Fgf5* encercle le pédoncule basal.

Ces résultats confirment donc le fait que *Fgf5* n'est exprimé que dans la GEE, mais indique que son expression n'est pas homogène dans cette couche et est localisée dans des régions et des cellules précises dans la GEE et le bulbe.

### 2.2.2 Augmentation de la durée de la phase anagène

D'après les résultats obtenus dans notre laboratoire et par d'autres groupes, l'inactivation du gène *Fgf5* conduit à une augmentation de la durée de la phase anagène [6, 16, 20, 21, 14, 8]. Ces différents travaux suggèrent que FGF5 jouerait un rôle dans l'initiation de la phase catagène.

Dans le cas des souris *Fgf5* -/-, on constate en effet, une augmentation très nette de la durée de la phase anagène par rapport aux souris sauvages ou *Fgf5* +/- (c.f. figure 2.4, page 11). En effet, dans le cas de la souris *Fgf5* +/-, l'expression de *Fgf5* commence à la naissance et cesse d'être exprimé à  $P_{16}$ , une semaine avant le déclenchement de la phase catagène ( $P_{24}$ ). Dans le cas de la souris *Fgf5* -/-, l'expression de *Fgf5* débute aussi à la naissance, mais son expression est prolongée jusqu'à  $P_{30}$  et diminue progressivement jusqu'à  $P_{38}$ , deux jours avant l'entrée en phase catagène ( $P_{40}$ ). Ces résultats démontrent qu'en l'absence de FGF5, la phase catagène est quand même initiée. Ces expériences ne peuvent pas

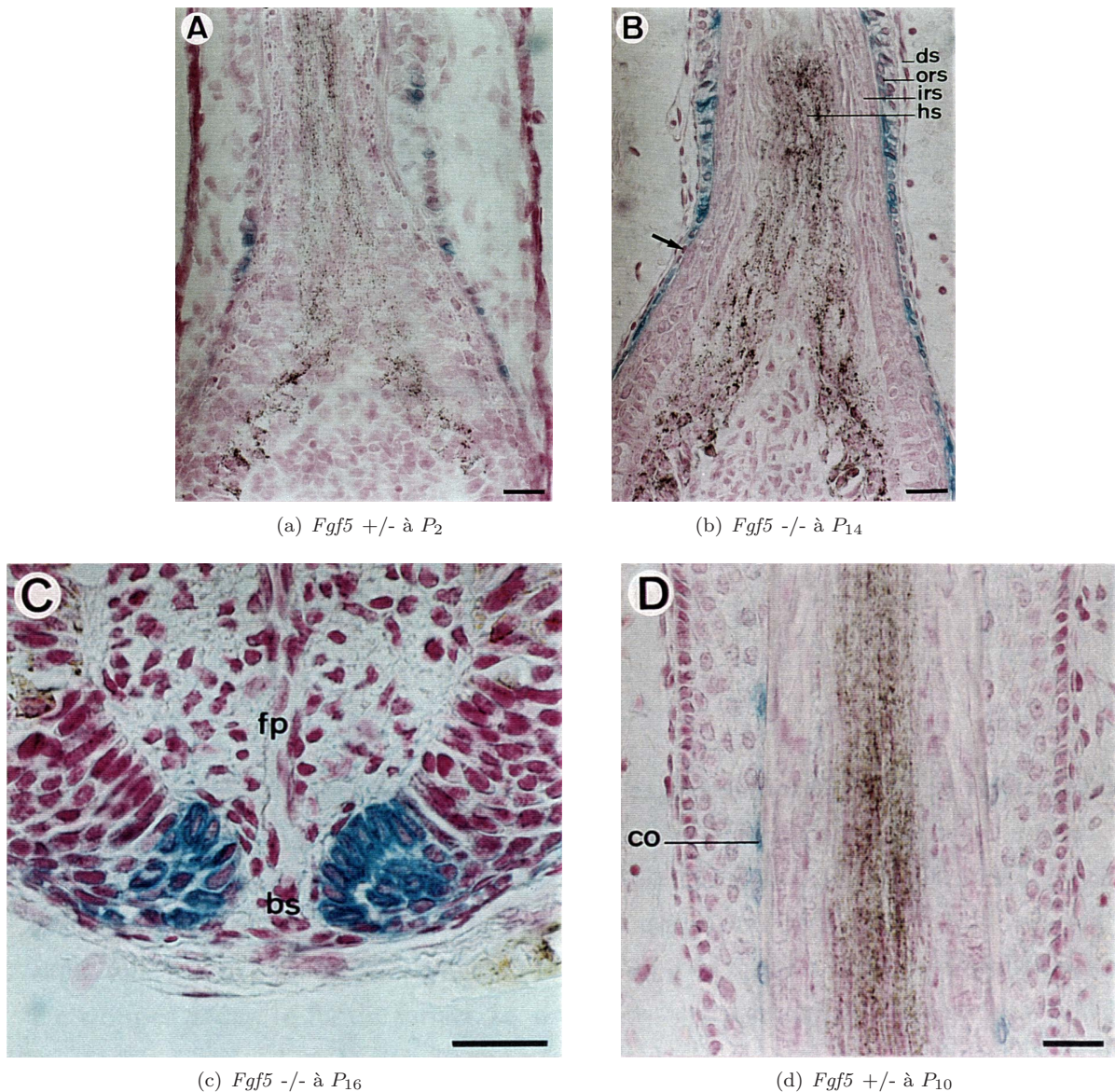


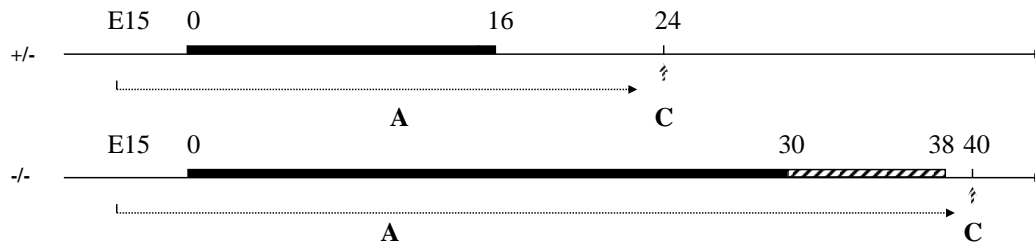
FIGURE 2.3 – Motif d'expression temporelle de *Fgf5* sur coupes de follicule de vibrisse

Coupes histologiques longitudinales de follicule de vibrisse *Fgf5* +/- ou -/- effectuées au cryostat (a) ou en paraffine (b-d) et colorées pour mettre en évidence la présence de la bêta-galactosidase. (a) : région suprabulbaire d'un follicule de vibrisse *Fgf5* +/- à  $P_2$ . (b) : région suprabulbaire d'un follicule de vibrisse *Fgf5* -/- à  $P_{14}$  où l'expression de *Fgf5* est située dans la couche basale et suprabasale de la GEE, mais certaines cellules de la couche basale ne semblent pas exprimer *Fgf5* (flèche). (c) : région basale du bulbe d'un follicule de vibrisse *Fgf5* -/- à  $P_{16}$  où *Fgf5* est fortement exprimé dans les cellules de la GEE et dans celles situées près du pédoncule basal. (d) : région intermédiaire d'un follicule de vibrisse *Fgf5* +/- à  $P_{10}$  où *Fgf5* est exprimé seulement dans quelques cellules de la couche des cellules compagnes. ds : gaine mésenchymateuse, ors : gaine épithéliale externe (GEE), irs : gaine épithéliale interne (GEI), hs : poil, fp : papille folliculaire, bs : pédoncule basal, co : couche des cellules compagnes. Echelle : 20  $\mu\text{m}$ .

exclure un rôle de FGF5 dans l'initiation de cette phase dans des conditions normales et suggèrent qu'il existe probablement un autre mécanisme indépendant de FGF5 pour induire la phase catagène.

### 2.2.3 Dimensions pilaires

Comme mentionné précédemment, les poils de vibrisse des souris *Fgf5* -/- sont 1.6 fois plus longs que ceux des souris sauvages ou *Fgf5* +/- (c.f. figure 2.5(b), page 11). D'après les observations, ils sont

FIGURE 2.4 – Influence de l'expression de *Fgf5* sur le cycle pileire

A : phase anagène, C : phase catagène, E : âge embryonnaire.

également plus fins lorsqu'on les compare aux souris sauvages ou *Fgf5* +/- à des jours identiques ( $P_8$  et  $P_{26}$ ). Par contre, au déclenchement de la phase catagène (souris sauvages et *Fgf5* +/- à  $P_{24}$ , souris *Fgf5* -/- à  $P_{40}$ ), les diamètres des poils sont identiques (c.f. figure 2.5(a), page 11). Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister une corrélation entre le diamètre du poil et l'initiation de la phase catagène.

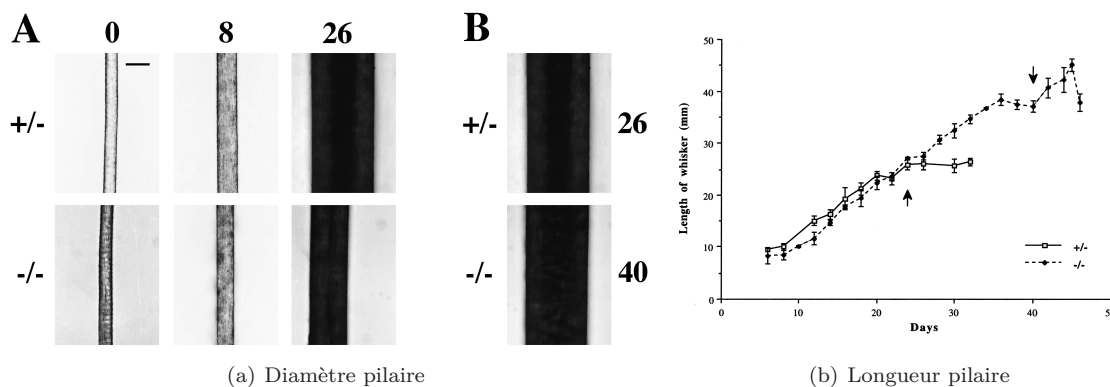


FIGURE 2.5 – Dimensions pileires au cours du temps

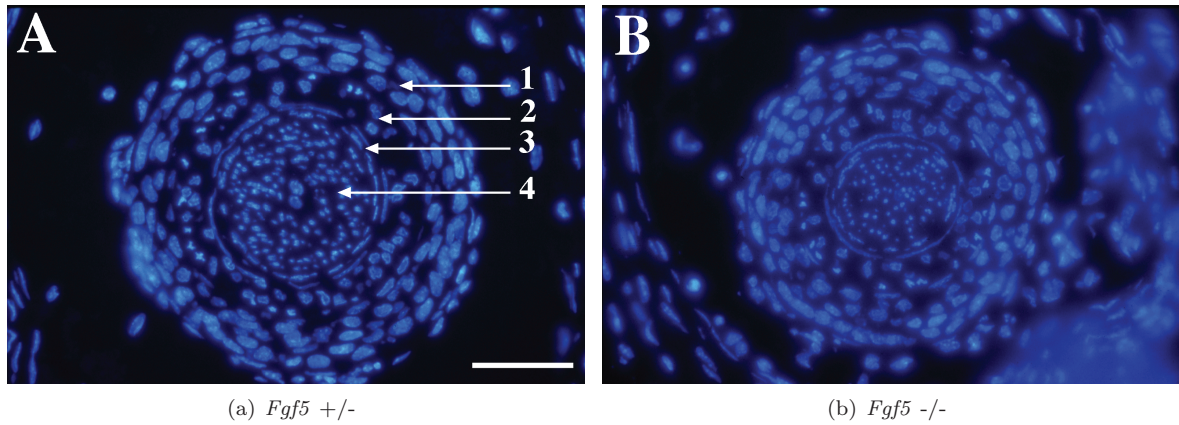
Le diamètre (a) et la longueur des poils (b) sont différents pendant la phase de croissance du follicule de vibrisse. Par contre, contrairement à la longueur finale du poil (dans (b) : les flèches indiquent l'entrée en phase catagène), on constate que le diamètre final est identique chez les deux types de souris lors de l'entrée en phase catagène.

## 2.2.4 Diminution du nombre de cellules dans le cortex

Le diamètre pileire varie en fonction du génotype (c.f. 'Dimensions pileires', page 10). Afin d'expliquer cette différence quantitative, le nombre de cellules des différentes couches qui forment le follicule de vibrisse a été vérifié pour chaque génotype. Les résultats de comptage montrent une diminution très claire du nombre de cellules du cortex du follicule de vibrisse chez les souris *Fgf5* -/- par rapport aux souris *Fgf5* +/-, respectivement 80 et 140 cellules (c.f. figure 2.6, page 12).

## 2.2.5 Modification du diamètre de la papille

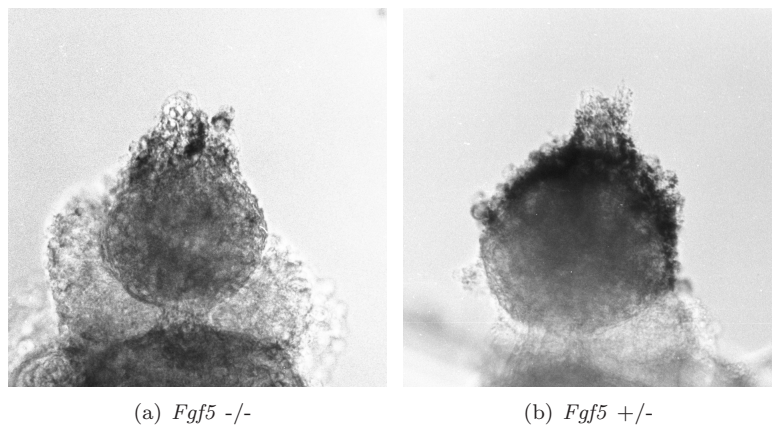
Sachant qu'il existe une corrélation entre le diamètre du poil et le diamètre de la papille folliculaire ([5, 7] et observations lors des microdissections), les diamètres des papilles ont été aussi mesurés à  $P_{19}$  (c.f. figure 2.7). Le diamètre des papilles folliculaires *Fgf5* +/- ont un diamètre moyen de  $155.2 \mu\text{m}$  ( $\pm 6$ ,  $n=4$ ) alors que celui des papilles folliculaires *Fgf5* -/- est de  $131.6 \mu\text{m}$  ( $\pm 7.3$ ,  $n=4$ ). Le diamètre des papilles folliculaires *Fgf5* -/- est donc plus petit que celui des papilles folliculaires *Fgf5* +/- (différence significative à  $p < 0.01$ ). Ces résultats ont été aussi confirmés sur des papilles isolées de vibrisses (*Fgf5* +/- et *Fgf5* -/-) à  $P_{15}$  et renforcent l'existence d'une corrélation entre le diamètre de la papille folliculaire



### FIGURE 2.6 – Densité des cellules corticales

Les follicules de vibrisse  $a_3$  ont été prélevés à  $P_{14}$  et sectionnés à un niveau suprabulbaire identique. On constate ainsi une différence dans le nombre de cellules du cortex entre les souris *Fgf5* +/- ou *Fgf5* -/-. Par contre le nombre de cellules des autres couches cellulaires du follicule de vibrisse demeure inchangé. 1= GEE, 2= GEI, 3= cuticules, 4= cortex. Marqueur : *Hoechst*<sup>TM</sup>. Echelle : 50  $\mu m$ .

et celui du poil.



### FIGURE 2.7 – Diamètre de la papille selon le génotype

Les follicules de vibrisse  $a_4$  ont été prélevés à  $P_{19}$  chez des animaux de même portée et les papilles extraites par microdissection. Une différence de taille apparaît clairement entre la papille hétérozygote et son équivalente homozygote, le diamètre mesurant respectivement 153  $\mu m$  et 130  $\mu m$ . Echelle : 50  $\mu m$ .

# 3

## Concepts technologiques

Afin de rendre possible une bonne compréhension de la partie ‘Développement méthodologique’, un certain nombre de concepts de microscopie confocale et d’informatique sont présentés ici.

### 3.1 Microscopie confocale

La microscopie confocale est née en 1957, imaginée par Marvin Minsky. Cette technologie prometteuse a cependant dû attendre ces 20 dernières pour connaître son véritable essor, propulsée par des avancées technologiques importantes telles que les ordinateurs personnels et les lasers. A l’heure d’aujourd’hui, la microscopie confocale est devenue un outil très prisé par les biologistes parmi les technologies microscopiques photoniques existantes. Sa capacité à rendre possible des observations moléculaires en haute résolution à l’échelle cellulaire ou tissulaire en fait un outil de prédilection. Ces dix dernières années ont vu un élargissement de la gamme des fluorochromes<sup>1</sup> et des objectifs, notamment à destination de l’imagerie cellulaire en temps réel (« live cell imaging »). Enfin, la possibilité de pouvoir désormais manipuler des images en haute résolution avec les ordinateurs a amené cette technologie à compter parmi les techniques indispensables en biologie. Ceci grâce à ses principaux avantages :

- sa capacité à pouvoir imager des cellules ou des tissus de manière interne grâce aux coupes optiques qu’il permet, et ceci en haute résolution
- la possibilité de travailler avec des longueurs d’ondes de lumière cohérente spécifiques<sup>2</sup>, rendant ainsi possible l’utilisation plus ou moins simultanée de plusieurs marquages différents

Sa haute sensibilité de détection des molécules de fluorescence et la possibilité de pouvoir effectuer des reconstructions tridimensionnelles à partir des images acquises font également partie des avantages de cette technologie.

Quatre types de microscopes confocaux existent à ce jour : à fente, à laser, à disque de Nipkov, et multi-photon. Celui employé dans le cadre de ce travail de thèse est à laser (Leica SP2 AOBs). Son principe repose sur un balayage à travers l’objet d’un point laser qui excite les molécules de fluorescence.

---

1. Ou fluorophores, marqueurs fluorescents

2. Lasers

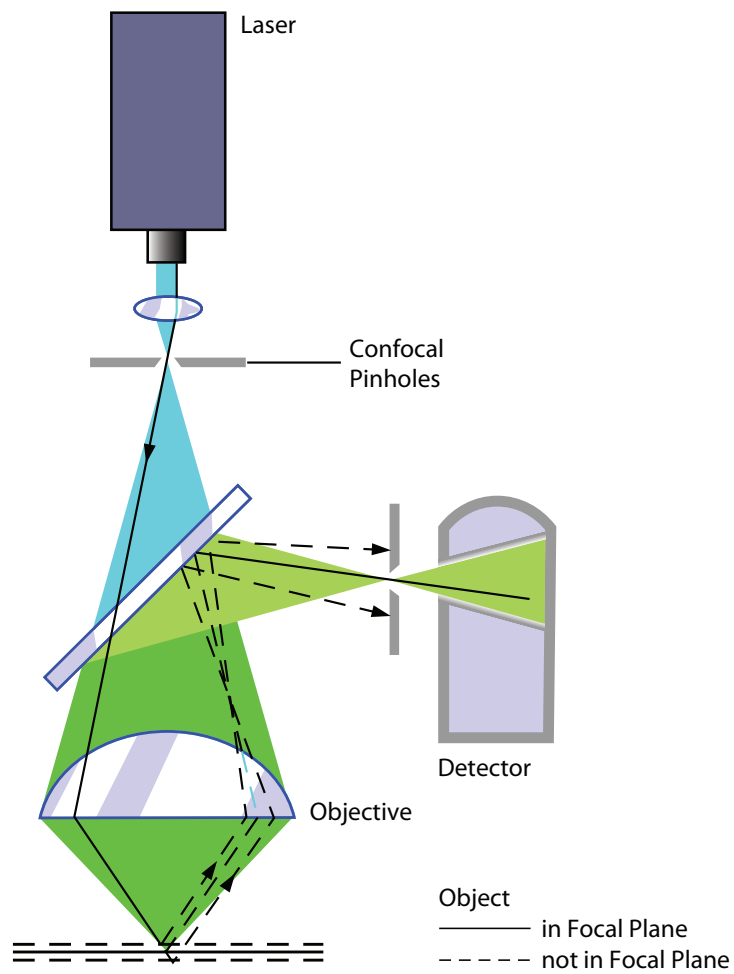


FIGURE 3.1 – Principe du microscope confocal

Le microscope confocal repose sur le principe que les rayons issus des plans annexes au plan focal sont éliminés par le diaphragme ou « pinhole ». Plus le pinhole est fermé, plus la discrimination axiale est importante mais moins on récolte de lumière. À l'inverse, plus le pinhole est ouvert, plus on récolte de lumière mais plus faible est la résolution axiale. *Illustration : Leica Microsystems<sup>TM</sup>*



### 3.1.1 Notions spécifiques

**Photobleaching** Il s'agit d'un phénomène physique qui conduit à la destruction du marqueur fluorescent. Une illumination trop intense dans une zone donnée de l'échantillon peut ainsi mener à une perte de fluorescence. L'importance de ce phénomène dépend de la durée et de l'intensité de l'illumination, ainsi que du type de molécules fluorescentes utilisées.

**Epifluorescence** La lumière d'excitation, émise par le laser utilisé, est dirigée vers l'échantillon grâce à un miroir particulier, appelé miroir dichroïde. Ce miroir reflète la lumière d'illumination du laser et laisse passer la lumière revenant de l'échantillon. Ce système de déviation de la ligne du laser offre ainsi l'avantage que l'intense lumière d'illumination est dirigée vers l'échantillon et non vers les détecteurs ou les oculaires, comme dans un système conventionnel. L'objectif joue dans ce type de système un double rôle, à savoir celui d'objectif et de condensateur. En effet, la lumière d'illumination est focalisée par l'objectif et la lumière résultant du phénomène de fluorescence est collectée par ce même objectif. On élimine ainsi le problème d'alignement du condensateur et de l'objectif.

**Le pinhole** Le pinhole est l'élément principal qui le distingue de tout autre microscope. Il s'agit d'un diaphragme qui coupe les rayons de fluorescence provenant de plans différents de l'échantillon que celui sur lequel le laser est actuellement focalisé<sup>3</sup> (c.f. figure 3.1, page 14). En effet, même s'il est concentré sur un point, le laser traverse les couches de l'échantillon et n'excite ainsi pas uniquement les molécules qui se trouvent à l'endroit du point laser. De plus, la lumière émise par les fluorochromes excitent également à leur tour, même dans une moindre mesure, d'autres molécules. Par conséquent, la lumière émise ne provient pas d'un seul plan mais d'un certain volume de l'échantillon. En restreignant l'ouverture du pinhole, on supprime la lumière hors focus, obtenant ainsi un plan focal très fin, que l'on définit comme étant une « coupe optique ». En déplaçant ensuite la position de l'échantillon par rapport à l'objectif, on obtient ainsi des coupes optiques à différentes profondeurs dans l'échantillon.

**PMTs** Les photomultiplicateurs sont des composants électroniques utilisés pour convertir la lumière détectée en courant électrique. Ce courant électrique peut être par la suite également amplifié en augmentant le gain, c'est-à-dire le voltage du photomultiplicateur. Il en résulte une augmentation de l'intensité lumineuse.

**AOTF** L'Acoustic Optical Tuneable Filter est un filtre qui permet de contrôler l'intensité du laser et par là même l'intensité d'illumination de l'échantillon. Le pourcentage de puissance du laser peut être contrôlé de manière continue de 0% à 100%. Contrôler la puissance du laser est important pour ne pas détruire l'échantillon, particulièrement dans le cas d'observation de cellules vivantes.

**AOBS** L'Acoustic Optical Beam Splitter est un composant optionnel de certains microscopes de Leica, dont le SP2. Ce composant remplace dans ce cas le miroir dichroïde, car il est plus précis. Il permet de rediriger de manière beaucoup plus fine et plus rapide les rayons du laser. La finesse se situe au niveau de la sélection des longueurs d'ondes qui sont réfléchies ou sont transmises.

## 3.2 Recalage informatique

Dans le panel des techniques de traitement d'images actuelles, les techniques de recalage d'images occupent une place importante. Les progrès constants des ordinateurs ces 15 dernières années en termes

---

3. Le laser produit un point de lumière net et précis à cet endroit

de puissance de calcul et d'espace de stockage ont rendu possible le développement de techniques de recalage d'images toujours plus perfectionnées et accessibles. Un des grands domaines bénéficiant ainsi de ces avancées technologiques est le domaine médical, où le recalage d'images joue désormais un rôle de choix à des fins cliniques (diagnostique, thérapeutique). D'autres domaines bénéficient également de ces techniques telle l'imagerie satellitaire.

D'un point de vue généraliste, le recalage d'images est une approche informatique permettant de rendre possible la mise en correspondance, dans un référentiel commun, d'images de même source (monomodales), de sources différentes (multimodales), de temporalités différentes ou encore de sujets différents. La solution d'un problème de recalage consiste donc en une transformation géométrique permettant l'alignement spatial des images (ou des volumes d'images), ou de caractéristiques de celles-ci (c.f. figure 3.2, page 16). Le recalage permet ainsi de pouvoir combiner des informations différentes ou complémentaires d'un même sujet d'étude, d'où son grand intérêt.

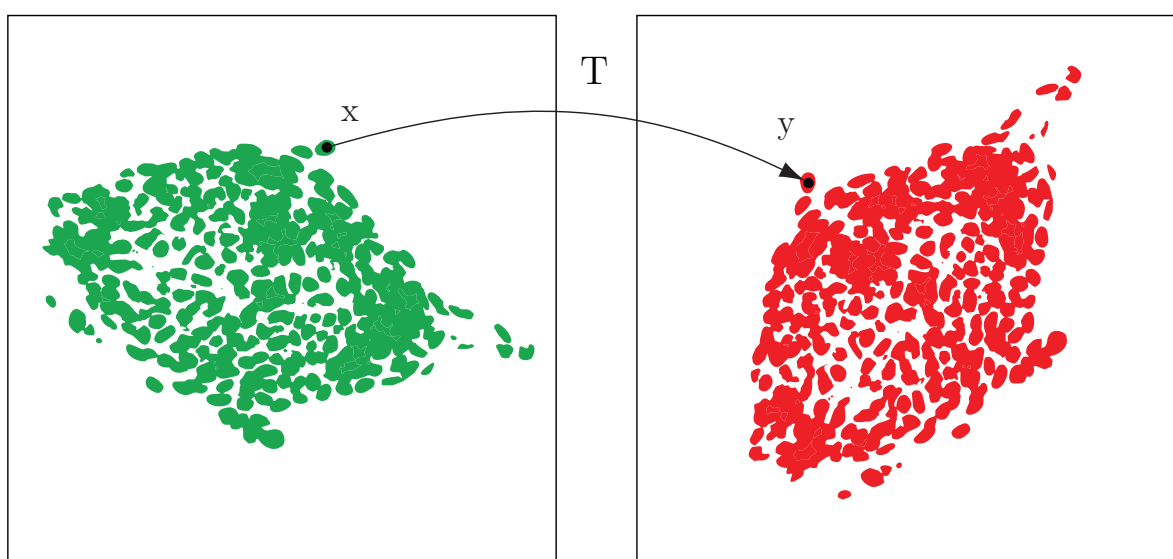


FIGURE 3.2 – **Concept de la transformation à rechercher**

Le recalage est le processus de recherche de la transformation spatiale qui fait correspondre les points d'une image aux points homologues dans l'autre image. En d'autres termes, il s'agit de trouver la transformation à appliquer à une image que l'on déplace — image en *mouvement* — pour l'aligner sur une image de référence — image fixe —. Le concept est identique pour des volumes d'images.

Toute méthode de recalage est définie par quatre éléments à considérer, à savoir :

- des caractéristiques d'images (ou *attributs*)
- un critère de ressemblance
- une transformation géométrique (ou *modèle de déformation*)
- une méthode d'optimisation

Les **caractéristiques des images**, ou attributs, sont les informations utiles extraites des images sur lesquelles on se base pour calculer le critère de similarité. Ces attributs peuvent être extrinsèques (repères externes fixés sur le sujet, e.g. repères dans un bloc de paraffine préparé pour des coupes histologiques) ou intrinsèques (intensités lumineuses des pixels, primitives géométriques<sup>4</sup> issues de segmentation d'images<sup>5</sup>). Dans le cadre du processus de recalage mis au point dans ce travail, les attributs utilisés sont

4. Forme géométrique telles point, ligne, triangle, polygone, courbes, surfaces

5. Opération de traitement d'images ayant pour but de mettre en évidence des formes géométriques dans les images, manuellement ou automatiquement

les intensités des pixels.

Le **critère de ressemblance**, mesure de similarité ou encore métrique, permet d'évaluer la qualité de l'alignement des images en quantifiant une relation existante entre les attributs des images (ou volumes d'images). En d'autres termes, elle se veut une mesure de l'exactitude du recalage. Elle fera l'objet d'une discussion sur son choix dans la partie 'Développement méthodologique' et l'analyse de son comportement sera discutée dans la partie 'Résultats'.

La **transformation géométrique**, est la transformation permettant d'aligner les images entre elles. Elle peut être rigide (translation, rotation) ou déformante (mise à l'échelle, distorsions locales ou globales) pour l'image que l'on recale sur l'autre. Elle est caractérisée par les valeurs de ses paramètres. Par exemple, pour une transformation représentant une rotation dans le plan, elle est définie par son angle de rotation. Le type de transformation choisi pour le processus de recalage présent est rigide puisqu'il s'agit d'une translation et d'une rotation.

La **méthode d'optimisation** recherche la meilleure transformation possible (i.e. les valeurs de paramètres idéales de la transformation), étant donnée une mesure de similarité évaluée sur l'espace de recherche défini par la transformation choisie. « L'espace de recherche » correspond à toutes les valeurs possibles de paramètres que peut prendre la transformation (angle de  $45^\circ$ ,  $6.2^\circ$ ,  $-124.1^\circ \dots$  pour une rotation dans le plan par exemple) et l'évaluation de la métrique correspond au calcul du score obtenu à partir des deux images une fois la transformation effectuée.

Dans un problème de recalage, le but est de trouver les valeurs des paramètres de la transformation pour laquelle on obtient une mesure de similarité dont le score est maximal. Effectuer une recherche exhaustive de toutes les valeurs possibles de paramètres est très peu efficace car consommatrice en temps de calcul. Par conséquent, on utilise un optimisateur qui détermine, à chaque étape de l'exploration, dans quelle direction rechercher pour parvenir à la transformation optimale. Cet optimisateur parcourt ainsi l'espace de toutes les valeurs possibles de la transformation à la recherche d'un minimum global et non local, où se trouve la transformation idéale. Afin d'y parvenir, il est nécessaire d'étudier le comportement de la métrique. Cette analyse sera présentée dans la partie des résultats (c.f. chapitre 'Résultats', page 59).



# 4

## Matériel et méthode

Le chapitre ‘[Développement méthodologique](#)’ (page 27), présente en détails la méthode développée, ainsi que les solutions envisagées et les choix effectués. Cette présente partie se veut donc uniquement descriptive.

### 4.1 Extraction de la papille folliculaire

- Découper les joues à l’aide de ciseaux de chirurgie
- Écarter le tissu conjonctif de sorte que les vibrisses soient dégagées du tissu environnant
- Prélever les vibrisses d’intérêt en les saisissant par l’extrémité haute de la capsule
- A l’aide d’aiguilles fines de 0.25 mm ou d’aiguilles à insuline, couper transversalement au-dessus du bulbe
- Faire ressortir la papille et la partie épithéliale restante du reste de capsule en maintenant celle-ci avec une aiguille et en poussant au niveau du pédoncule basal avec l’autre. Cela a un effet équivalent à un « retroussement de chaussette »
- Retirer au maximum la partie épithéliale entourant la papille

### 4.2 Fixation et marquage

- Fixer les papilles folliculaire à température ambiante avec de la PAF 4% pendant 20 minutes
- Rincer au PBS 1x, 2 fois 10 minutes
- Mettre à marquer les papilles dans du Draq5, à dilution de 5  $\mu$ l pour 1 ml de PBS 1x, et à 4 ° C. Un minimum de 8h semble nécessaire pour obtenir un bon marquage
- Rincer au PBS 1x, pour éviter au maximum un bruit de fond dû à des molécules libres. Un minimum de 48h semble nécessaire

**Note** La préparation des échantillons au niveau du marquage est essentielle afin de garantir une bonne qualité d’image. Si la durée de marquage est trop courte, le fluorochrome ne pénètre pas suffisamment

dans l'échantillon. Si le rinçage n'est pas effectué correctement, le fluorochrome qui ne s'est pas lié au noyau ajoutera du bruit de fond. Il est donc essentiel d'effectuer ces opérations avec minutie, faute de quoi la profondeur d'acquisition sera fortement réduite.

### 4.3 Montage

Le support a été découpé dans des plaques de PET (Bayer Vivak PetG, 28mm d'épaisseur). Les coverslips utilisés doivent mesurer 170  $\mu\text{m}$  d'épaisseur en tout point.

- Nettoyer à l'éthanol 70% les coverslips
- Fixer le premier coverslip au support avec de la colle cyanolite liquide. Attention aux vapeurs, qui rendent facilement les coverslips opaques. La meilleure méthode est de laisser sécher sur une grille pour que l'air circule.
- Parallèlement, coller le double adhésif prédécoupé sur le deuxième coverslip. Ne pas retirer encore le papier de protection sur l'autre face.
- Transférer la papille sur le coverslip du support. Les transferts se font dans des gouttes de PBS, pour éviter la dessiccation. La papille folliculaire ne peut être manipulée directement. Pour ce faire, manipuler par adhérence avec d'autres coverslips et effectuer les transferts en laissant tomber une goutte sur le coverslip sur lequel se trouve la papille.
- Une fois la papille sur le coverslip, faire en sorte qu'elle soit centrée par rapport à celui-ci (important).
- Apposer le deuxième coverslip, adhésif direction support, en ayant préalablement retiré le dernier papier de protection.
- Remplir la chambre par les ouvertures dans le scotch, attention à éviter la formation d'une bulle d'air au contact de la papille. Si tel s'avère le cas, démonter tout le montage, récupérer la papille et recommencer. . .
- Sceller le montage avec du vernis, pour éviter l'évaporation.

### 4.4 Microscopie confocale

Prévoir d'adapter le microscope à la température d'acquisition de 30 ° C minimum 2 heures avant de commencer les acquisitions. Les acquisitions ont été effectuées avec un microscope Leica TCS SP2 Inverted, à une température de 30 ° C maintenue via une chambre connectée à un régulateur thermique. Utiliser l'objectif 20x 0.7 HC PL APO CORR lbd.Bl glycérol (506191) de Leica. Précaution : vérifier que le profil assigné à l'objectif corresponde.

- Sélectionner l'objectif 20x et déposer une goutte de solution glycérol prévue pour cet objectif
- Faire la mise au point sur l'échantillon, en lumière blanche
- Passer en mode acquisition, réflexion, mode XZ
- Régler le laser 633 en émission à 75% de sa puissance
- Régler le PMT4 pour récupérer le spectre d'émission entre 660 et 840 nm
- Ajuster la correction de la diffraction avec la bague de l'objectif. On doit obtenir une concentration de pixels saturés sur la zone de l'image où l'on devine le coverslip
- Repasser en mode XY, laisser la vitesse de scan à 400 Hz, résolution d'acquisition en 512x512, régler la profondeur de codage à 12 bits
- Tourner le champ de rotation afin de positionner la papille selon la diagonale (c.f. figure 5.10, page 41)
- Ajuster le zoom afin qu'il soit le plus important possible. Attention, vérifier que l'ensemble de la

- papille rentre dans le champ de vision, à toutes les hauteurs d’acquisition
- Passer en résolution de scan 2048x2048
- Régler le moyennage par ligne à 16
- Activer le scan bidirectionnel et corriger la phase. Choisir une zone claire pour cela, et un zoom d’affichage de 2 :1. La valeur se situe habituellement entre 21.61 et 21.74
- Se positionner au milieu de l’échantillon pour effectuer le réglage de l’offset et du gain. Règle à suivre : quelques pixels bleus (gain) et quelques pixels verts pour une acquisition pleine qualité. Une fois réglé, ne plus toucher à l’offset
- Régler la platine en mode de déplacement « wide ». Descendre jusqu’au point le plus bas de l’échantillon où l’on souhaite encore acquérir. Passer en mode de déplacement « galvo » (permet d’avoir toute la distance du galvo à disposition pour l’acquisition)
- Fixer la borne inférieure au point actuel
- Remonter par pas de 10  $\mu m$ , régler la compensation du gain à chacune de ces positions. Une fois sorti de l’échantillon, fixer la borne supérieure. Attention, il est préférable d’avoir une image totalement noire en dehors de l’échantillon comme première image acquise. Cette image sera utilisé pour le calcul du ratio signal / bruit pour l’étape de déconvolution
- Lancer l’acquisition. A la fin retourner et refaire les réglages, à l’exception du zoom scanner

**IMPORTANT** : il est nécessaire de ne pas modifier la valeur de zoom du scanner utilisée entre deux acquisitions. Éviter ainsi de faire des manipulations réinitialisant le microscope, comme passer en mode réfraction pour ajuster la bague (cette opération ne s’effectue que la première fois)

## 4.5 Déconvolution

L’opération de déconvolution se fait via l’interface web Huygens Remote Manager. La description de cette étape se limitera à la description de la démarche pour déterminer la rapport signal/bruit, le reste des paramètres étant fournis par le fichier d’expérience enregistré avec les images à l’acquisition.

**Intensité du background** Pour estimer la valeur moyenne d’intensité du fond de l’image, on utilise *Bitplane Imaris<sup>TM</sup>*. On se positionne sur la première image qui, si le protocole d’acquisition a été respecté, doit être complètement noire. Il est alors possible de pouvoir déterminer l’intensité moyenne des pixels du fond noir en déplaçant la souris et en relevant la valeur moyenne des intensités des pixels pointés successivement par le curseur de la souris.

**Intensité du bruit** Pour déterminer le bruit de Poisson résultant des photomultiplicateurs, on compresse vers la gauche la répartition des intensités via la palette « Display Ajustment », afin que les faibles intensités du fond de l’image apparaissent plus claires. Les pixels de l’image étant du bruit se caractérisent ainsi par des valeurs de pixels plus élevées que la moyenne des intensités relevées au point précédent.

**Intensité maximale de signal** Cette valeur se détermine plus simplement. Elle consiste en la valeur de pixel maximale rencontrée sur l’ensemble des images de la pile. Dans notre cas, comme normalement les images doivent comporter quelques pixels saturés, la valeur est fixée par défaut au maximum possible, à savoir 4095.

Le calcul du ratio se fait simplement via la formule présentée dans le chapitre suivant (c.f. ‘[Déconvolution](#)’, page 46).

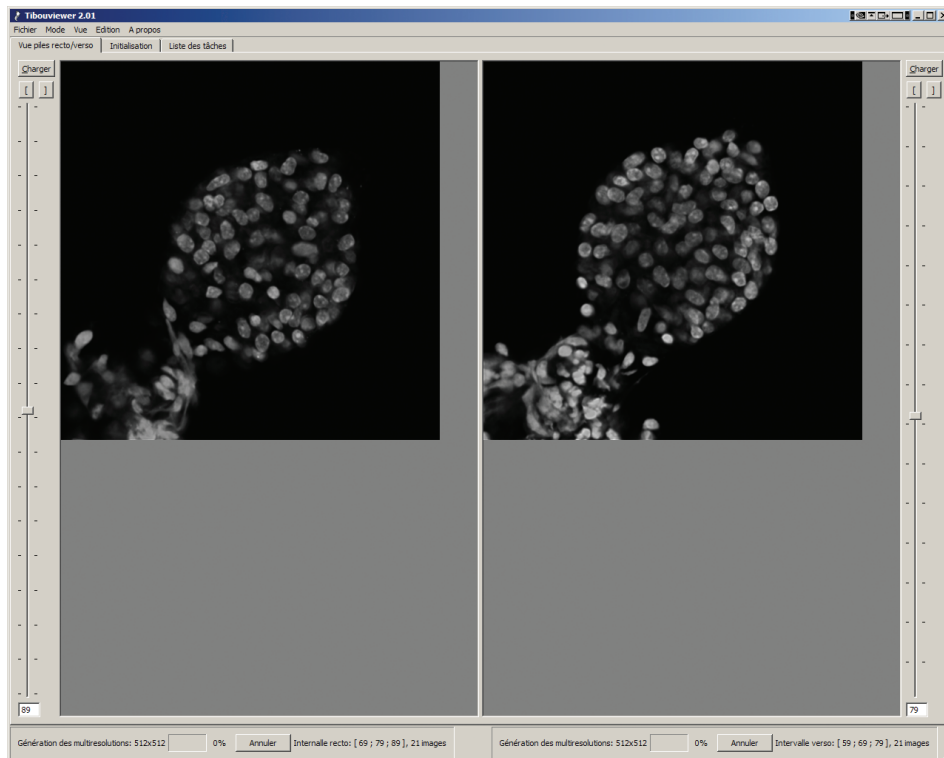


FIGURE 4.1 – Interface graphique de visualisation et de sélection des images

Cette partie de l'interface permet de sélectionner les images communes entre les volumes entiers *recto* et *verso*, images qui vont constituer les sous-volumes *recto* et *verso* utilisés pour le recalage.

## 4.6 Recalage

### 4.6.1 Sélection des images des sous-volumes

- Ouvrir l'application « TibouViewer » (c.f. figure 4.1, page 22) et charger les images dans l'interface (« *Ctrl+O* »)
- Identifier dans chaque pile l'image qui constituera l'image médiane du sous-volume. Les images sélectionnées doivent correspondre entre les deux piles. Fixer ensuite pour chaque pile la borne inférieure et supérieure du sous-volume en cliquant sur les boutons « [ » et « ] ». Ces bornes doivent être fixées de telle manière à ce que l'image médiane précédemment choisie reste centrée par rapport au sous-volume.
- Vérifier les bornes
- Cliquer sur l'onglet « Initialisation »
- Dans la vue en superposition (c.f. figure 4.2, page 23), cliquer sur « Simulation rotation », choisir « Y »
- Faire tourner l'image avec la barre de défilement pour positionner l'image parallèlement
- Ajuster la translation avec les barres de défilement « X » et « Y »
- Relever les valeurs affichées dans l'interface

### 4.6.2 Exécution du recalage

- Créer un fichier de données initiales en ouvrant l'« Éditeur des paramètres initiaux » (c.f. figure 4.3, page 24). Régler les valeurs de rotation  $R_{O_x}(\alpha) = 0$ ,  $R_{O_y}(\beta) = 180$  et  $T_z = 0$ . Spécifier également les répertoires des images à recalage et le répertoire de destination des fichiers produits par le recalage
- Entrer la valeur initiale de rotation  $R_{O_z}(\gamma)$  et de translation  $T_x$  et  $T_y$  selon les valeurs relevées dans



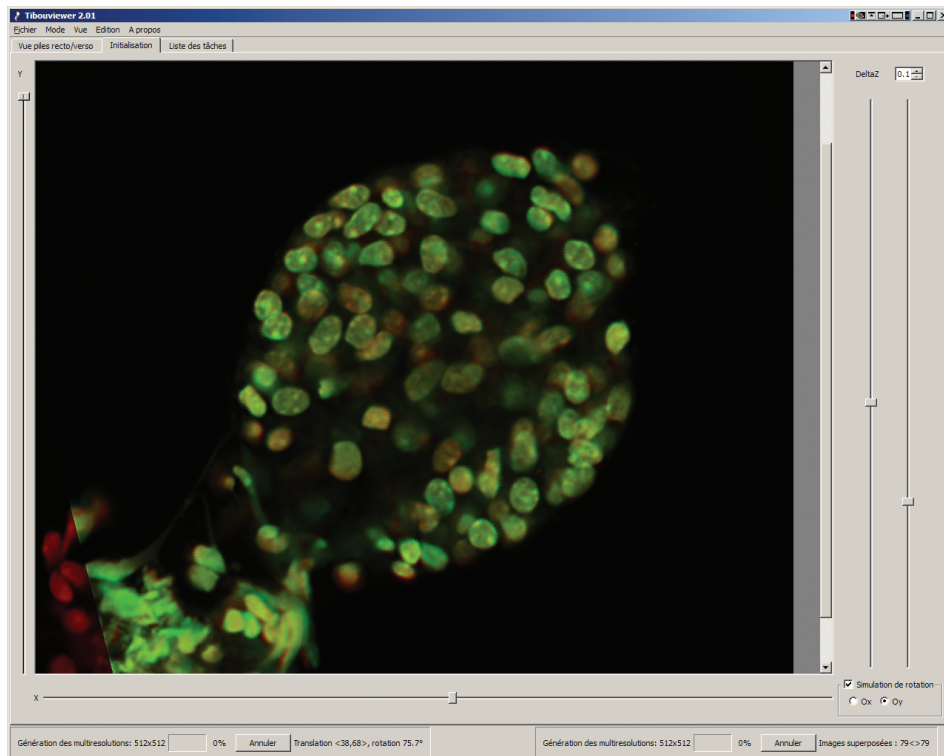


FIGURE 4.2 – Interface graphique du recalage manuel

Cette partie de l'interface permet la détermination des paramètres de la transformation initiale en superposant les images médianes des sous-volumes *recto* et *verso*. L'angle de rotation dans le plan des images et la translation selon les axes  $Ox$  et  $Oy$  peuvent ainsi être fixés. A noter qu'il est également possible de pouvoir observer les images à des zooms numériques différents pour plus de confort et de précision.

l'interface

- Entrer les numéros des images constituant les sous-piles *recto* et *verso*
- Entrer la taille du voxel des images
- Entrer les valeurs de pas minimum et maximum de l'optimisateur, ainsi que le nombre d'itérations maximum
- Entrer les poids attribués aux différents paramètres. Plus la valeur est importante et plus l'accent est mis sur le paramètre correspondant
- Enregistrer le fichier
- Ouvrir une fenêtre de commande et taper la commande :

*recalage3D.exe nomFichierParametresInitiaux.tid*

Le recalage produit un fichier à l'extension *tfd*, contenant les données initiales et finales du recalage (c.f. figure 4.4, page 24)

### 4.6.3 Fusion des images

- Ouvrir une fenêtre de commande et taper la commande :  
*fusionnerPiles.exe nomFichierParametresFinaux.tfd*
- Le recalage produit un fichier à l'extension *tfd*, contenant les données initiales et finales du recalage, qui est fourni ici en entrée au programme
- Charger les deux piles d'images produites dans l'application « TibouViewer » (c.f. figure 4.1, page 22) pour déterminer quelles images choisir de chaque pile afin de constituer le volume final entier
- Utiliser le script *renommerFichiers.pl* pour renommer les fichiers

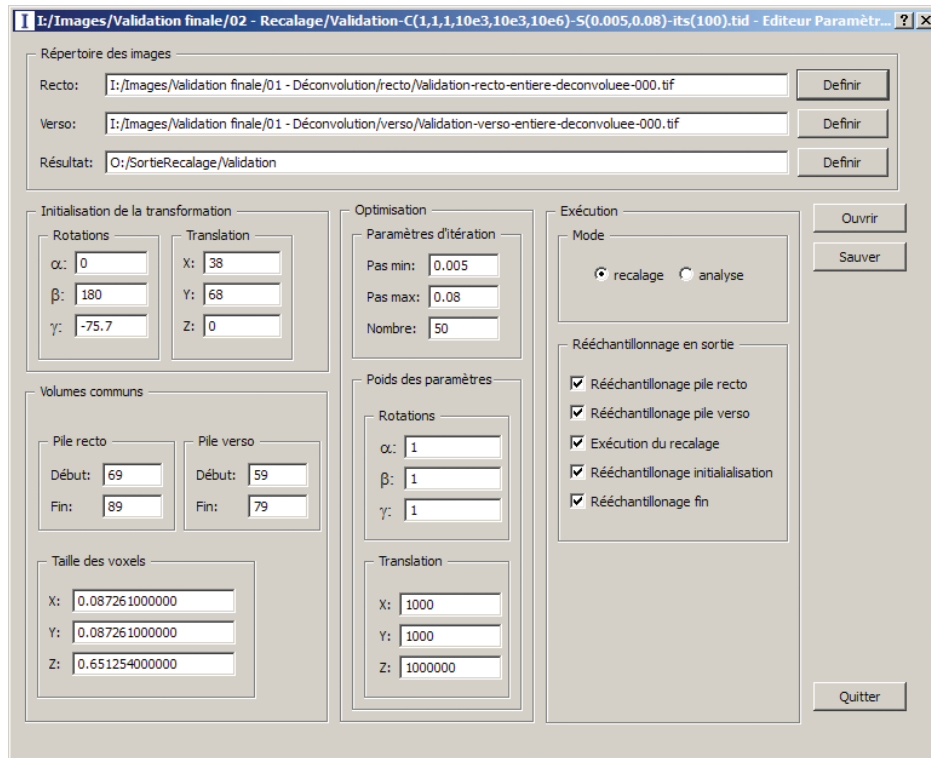


FIGURE 4.3 – Interface graphique d'édition des paramètres initiaux

Cette interface permet de visualiser et de modifier les valeurs des paramètres du recalage et de la transformation initiale. Les données sont enregistrées dans un fichier binaire au format propriétaire.

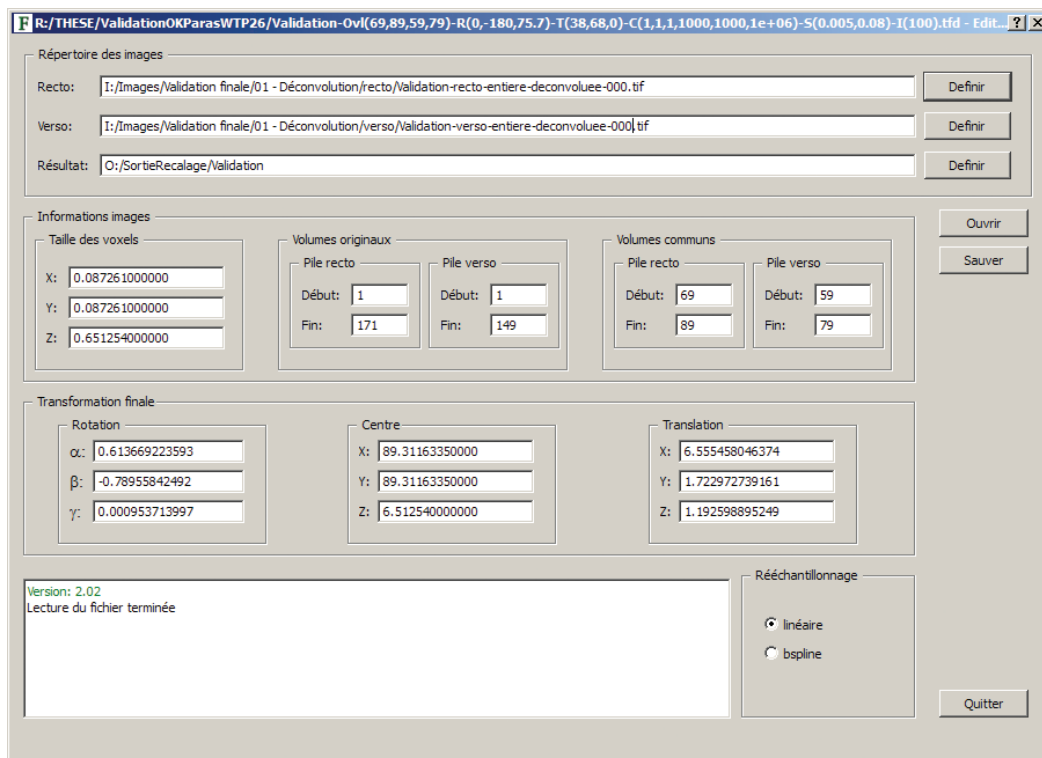


FIGURE 4.4 – Interface graphique d'édition des paramètres finaux

Cette interface permet de visualiser et de modifier les valeurs des paramètres du recalage et de la transformation finale. Les données sont enregistrées dans un fichier binaire au format propriétaire.

## 4.7 Comptage

- Charger le volume reconstitué dans *Bitplane Imaris<sup>TM</sup>*
- Dans le menu « Surpass », créer un volume pour visualiser les images
- Dans le menu « Surpass », choisir la fonctionnalité « Spot Detection »
- Décocher « Segment only a ROI », puis cliquer sur next
- Fixer le diamètre à estimer à  $4 \mu m$ , cocher « Background subtraction »
- Après le premier traitement, choisir le filtre « Quality » et fixer les paramètres sur « Automatic » et « High values »
- Pour vérifier la qualité du comptage, l'outil « Orthoslicer » est le plus adéquat. Cependant, il est également possible d'utiliser des « Clipping planes ». Pour ajouter ou enlever des noyaux, l'opération est effectuée par combinaison *shift+clic gauche* en ayant l'objet Spot sélectionné, l'onglet « edit » sélectionné et le pointer sur « Select »



# 5

## Développement méthodologique

L'objectif consiste à mettre au point une méthode rendant possible le dénombrement des noyaux de la papille folliculaire. Ceci nécessite de s'intéresser à trois domaines différents, à savoir la biologie, la microscopie et l'informatique, comportant chacun leurs problèmes spécifiques. Les solutions retenues s'inscrivent ainsi dans un processus d'expérimentation où chaque étape fournit un résultat optimisé pour l'étape suivante, tout en tenant compte des répercussions sur le bien-fondé du résultat biologique final (c.f. figure 5.1, page 28).

### 5.1 Obtention et filtrage de l'information

Les cellules de la papille folliculaire étant mononucléées<sup>1</sup>, un dénombrement des cellules revient donc à réaliser une énumération des noyaux. L'observation et l'acquisition d'images étant le meilleur support à disposition, reste à définir les choix techniques pour l'obtention de l'information visuelle sous une forme pertinente et la plus exacte possible.

#### 5.1.1 Constitution d'un volume de noyaux

Le comptage devant s'effectuer sur l'ensemble des noyaux de la papille folliculaire, la collection d'images successives à des profondeurs différentes est la démarche la plus appropriée. Deux approches sont possibles : une découpe physique de l'échantillon d'une part ou une découpe purement « virtuelle<sup>2</sup> » d'autre part. Dans les deux cas, l'ensemble des images permet une reconstitution du volume par empilement des images.

La découpe physique, e.g. histologie ou immunohistochimie, atteint une finesse de coupe de l'ordre de 8 à 3  $\mu\text{m}$  selon le matériau d'inclusion de l'échantillon (O.C.T, parafine, ou résine époxy). Cette méthode comporte deux désavantages majeurs : la possibilité de perte de coupes ou encore de déformation du tissu à la manipulation, et le fait que les images, acquises séparément, nécessitent d'être recalées dans leur ensemble par traitement informatique afin de pouvoir reconstituer le volume correctement aligné.

---

1. Par opposition aux syncytiums, e.g. myotubes, ostéoclastes. . .

2. Constitution de sections optiques, obtenues par déplacement du focus sur la dimension axiale de l'échantillon

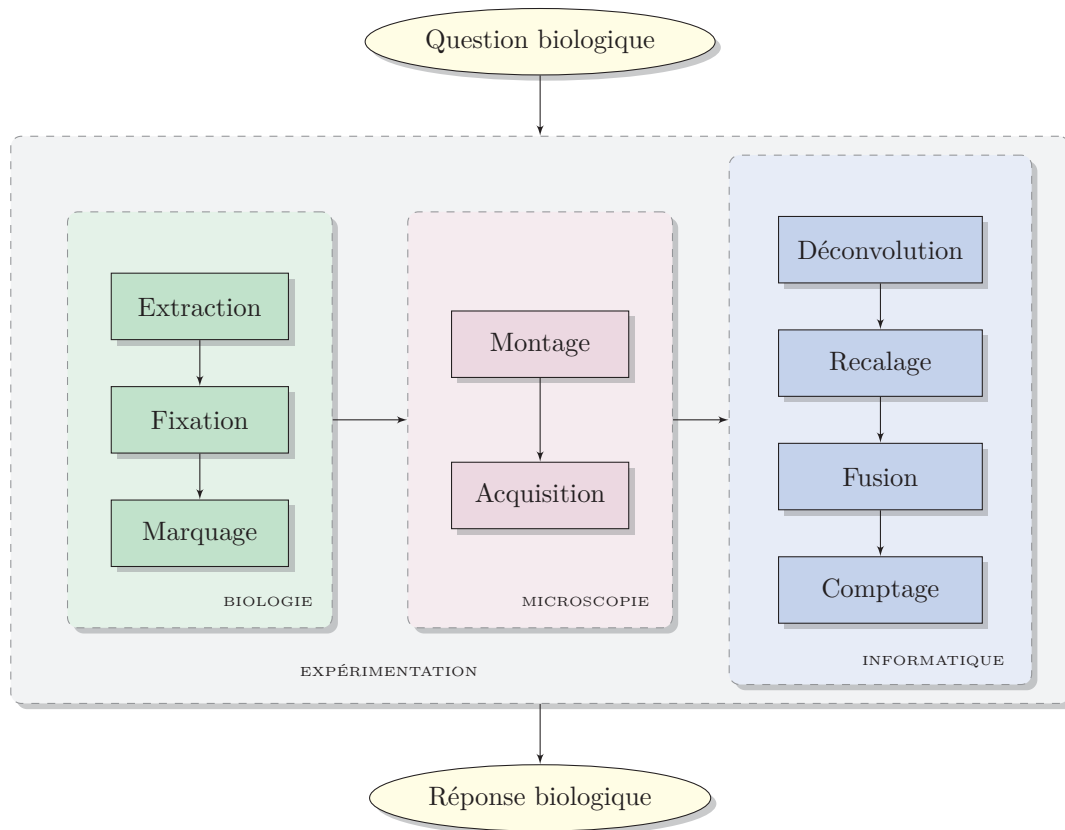


FIGURE 5.1 – **Processus d'expérimentation**

La question biologique de départ nécessite la mise au point d'une méthode comportant trois volets distincts touchant à la biologie, la microscopie et l'informatique. La prise en compte des possibilités et limitations de chacun des trois domaines permet de prendre des décisions facilitant l'expérimentation et optimisant le résultat à chaque étape. Ceci permet d'un point de vue global de garantir la pertinence du résultat final.

De plus, la finesse minimale de coupe pose problème dans notre cas, sachant que les noyaux de la papille folliculaire peuvent avoir une taille inférieure à  $3 \mu m^3$ .

La découpe optique, en revanche, s'affranchit de ces problèmes, et est particulièrement plus adaptée :

- les images sont alignées dû au mode d'acquisition lui-même
- la finesse de coupe est bien supérieure à ce qui peut être physiquement accompli (en-dessous du micromètre)
- l'épaisseur des coupes et leur espacement sont plus précis

### 5.1.2 Marquage spécifique

Le marquage spécifique des noyaux est un premier procédé permettant une sélection des éléments à considérer et un filtrage de ceux non désirés. En lumière blanche, il contribue à la mise en évidence des noyaux par rapport aux tissus environnants<sup>3</sup>. En fluorescence, il conduit à l'observation exclusive de ceux-ci, les éléments absents de tout marquage restant ainsi invisibles. Dans le but d'un traitement informatique des images acquises, l'imagerie en fluorescence est donc à privilégier. Les noyaux étant bien individualisés par rapport à leur environnement, certaines techniques de traitement d'images peuvent ainsi donner de meilleurs résultats. Les objets discrets qu'ils représentent sont plus aisément dénombrables.

Pour ce faire, nous disposons dans le commerce de fluorochromes nucléaires qui, excités à la longueur

3. Sous le logiciel Bitplane Imaris, les mesures indiquent une largeur pouvant descendre jusqu'à  $2 \mu m$ .

4. Colorant rouge nucléaire (*fast red*, Kernechtrot) par exemple

d'onde appropriée, émettent des ultraviolets (e.g. *Hoechst<sup>TM</sup>*) aux infrarouges (e.g. *DRAQ5<sup>TM</sup>*), en passant par les verts (e.g. *Sytox Green<sup>TM</sup>*). Comme il s'agit de ne marquer que les noyaux, la largeur de la courbe d'émission n'est pas une préoccupation en soi du fait de l'utilisation d'un seul marqueur. Dans le cas de l'utilisation de plusieurs marqueurs, il faudrait veiller à choisir des fluorophores dont les courbes individuelles d'émission évitent un maximum de se chevaucher.

La longueur d'onde d'excitation par contre joue un rôle important concernant la profondeur de pénétration dans l'échantillon. En effet, celle-ci est proportionnelle à la longueur d'onde de la lumière monochromatique employée : plus la longueur d'onde est élevée, plus l'acquisition peut être profonde. La perte de résolution qui résulte de l'utilisation d'un laser infrarouge en lieu et place d'un laser UV par exemple ne porte pas ici à conséquence, car la taille des plus petits noyaux se trouve bien au-delà de la résolution minimale.

Enfin, la résistance du fluorophore au « photobleaching » est un élément à prendre en considération dans le choix du marqueur : la résolution des images étant importante, il est nécessaire de choisir un fluorochrome résistant. Certains fluorophores sont en effet plus sensibles que d'autres à une trop forte illumination et peuvent donc être détruits plus facilement.

Pour toutes ces raisons, le choix s'est porté sur un marqueur de *Biostatus Limited*, le *DRAQ5<sup>TM</sup>*. En plus du fait que son excitation et son émission se situe dans les rouges lointains, ce fluorochrome est particulièrement résistant au photobleaching. En outre, il est également particulièrement homogène et propre au niveau du marquage comparé au *Hoechst<sup>TM</sup>* par exemple, qui donne lieu à plus de bruit de fond.

### 5.1.3 Densité cellulaire dans la région bulbaire

L'observation interne du follicule de vibrisse n'est pas aisée. La forte densité cellulaire des tissus épithéliaux, particulièrement au niveau bulbaire, est un premier problème auquel on se retrouve confronté. Si la pénétration des rayons lumineux n'est pas un problème en soi, le « mur » que constitue la matrice (c.f. 'Structure du follicule de vibrisse', page 1) provoque une forte diffraction des rayons lumineux émis par les fluorophores excités. La profondeur d'acquisition est ainsi fortement altérée, les images devenant moins lumineuses, plus floues et comportant plus de bruit de fond, au fur et à mesure que la profondeur d'acquisition augmente.

Afin de contourner l'obstacle que représente cette barrière naturelle, on exploite ainsi un clivage physique existant entre la papille folliculaire et la matrice. Cette séparation<sup>5</sup> permet, lors de la microdissection, d'arriver à séparer le tissu épithélial du tissu dermique. En pratique, la majorité du tissu épithélial peut être ainsi enlevée, mais pas toujours entièrement, les instruments à disposition n'étant pas suffisamment adaptés et précis (c.f. figure 5.3, page 31). Ces reliquats épithéliaux peuvent poser problème lors de l'acquisition notamment : les noyaux épithéliaux étant plus larges et plus ronds que leurs équivalents dermiques, leur surface marquée est donc plus importante et émet en comparaison plus de lumière. Il en résulte une saturation plus facile dans l'image, qui peut se faire au détriment de la luminosité des noyaux de la papille folliculaire (c.f. figure 5.2, page 30).

Ce contraste lumineux peut avoir un impact au moment du décompte final : outre le fait que le nombre de noyaux épithéliaux puisse se retrouver inclu dans le total, la faiblesse du signal de certains noyaux de la papille folliculaire peut avoir pour conséquence que ceux-ci ne soient pas dénombrés. Il faut donc spécialement prendre soin d'enlever un maximum ces tissus indésirables. On peut ensuite diminuer l'impact de ceux restants en effectuant un recentrage du champ de vision à l'acquisition. Enfin, lors du comptage final, il sera toujours possible de corriger manuellement les erreurs de détection (c.f. 'Correction

---

5. La lame basale. Matrice extracellulaire formée de diverses protéines et glycoprotéines, présente entre tout tissu cellulaire épithélial et son tissu conjonctif sous-jacent

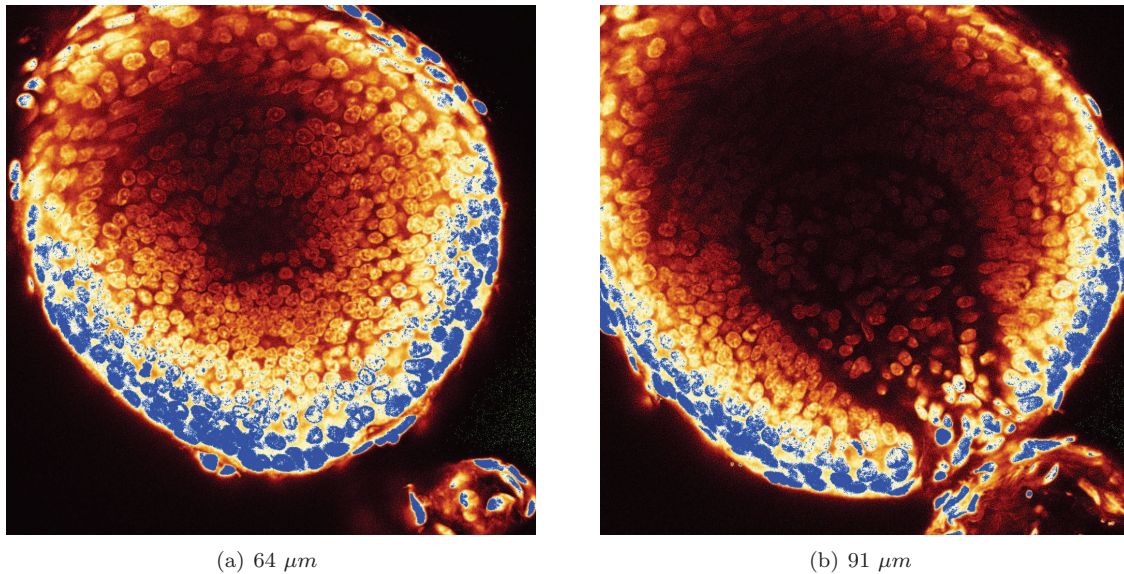


FIGURE 5.2 – **Densité cellulaire de la matrice**

La très forte densité nucléaire de la matrice constitue une barrière naturelle qui diffracte fortement les rayons lumineux, réduisant ainsi la profondeur et la qualité d'acquisition. Le gain en photomultiplication et la puissance laser ont été volontairement forcés ici afin de mettre en évidence la structure interne de la papille. Marqueur nucléaire, *DRAQ5<sup>TM</sup>*.

des erreurs de reconnaissance', page 58).

#### 5.1.4 Limitation de la profondeur d'acquisition

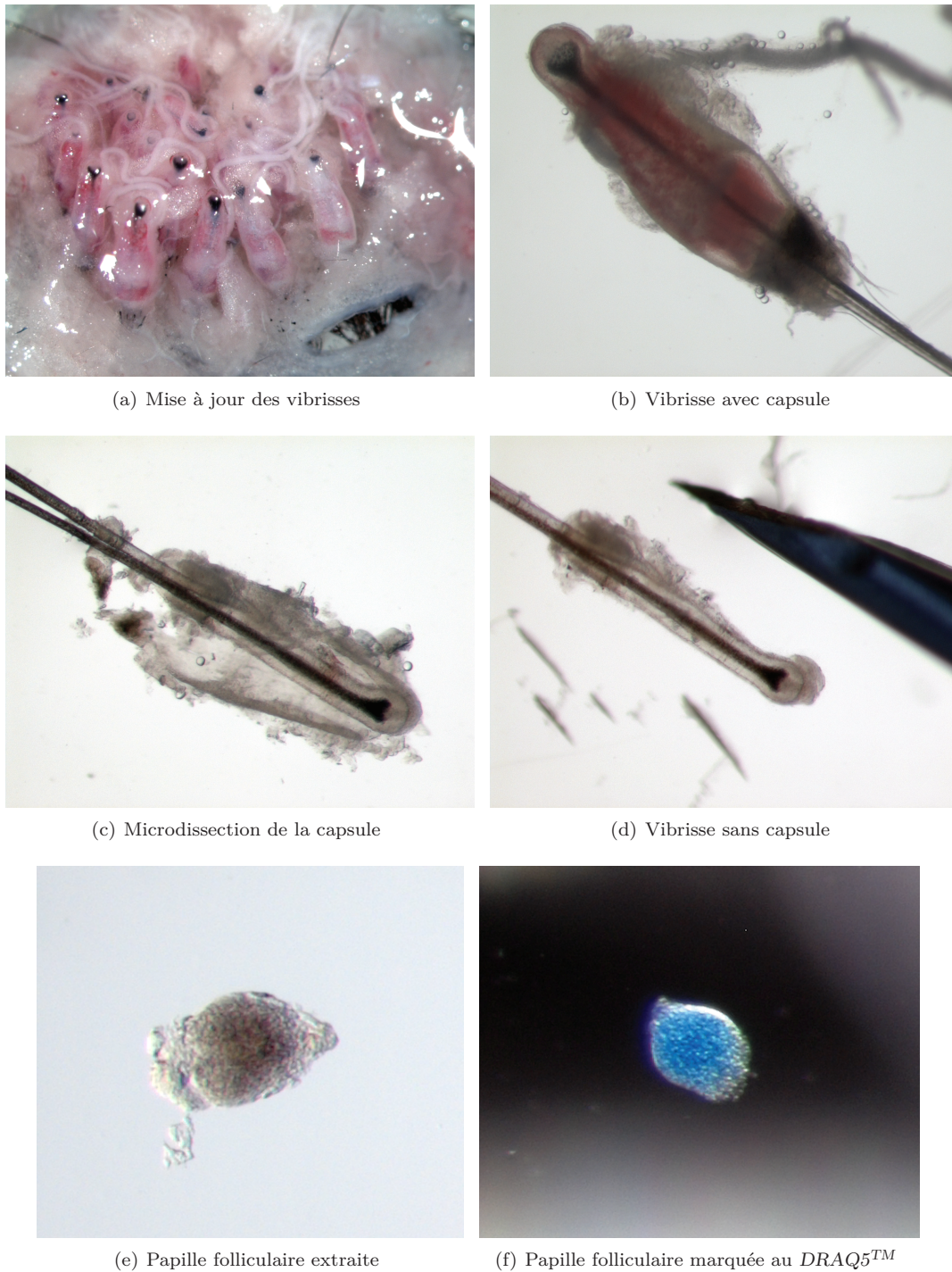
Si l'extraction de la papille folliculaire apporte un gain de profondeur d'acquisition, elle n'en constitue pas pour autant une solution finale. En effet, bien que la suppression de la matrice permette en moyenne de réduire de moitié le diamètre de l'échantillon (de 300  $\mu m$  environ à 140-160  $\mu m$ ), on se situe cependant à la limite des possibilités d'un microscope de type confocal. A l'expérimentation, mis à part quelques rares cas où les échantillons sont particulièrement petits, il demeure impossible de pouvoir scanner la structure en entier, les images se dégradant de plus en plus rapidement une fois la moitié du volume dépassée. En effet, plus l'on descend avec les coupes optiques dans la papille folliculaire, et plus il est difficile de collecter les rayons issus des noyaux de ces plans, la partie supérieure déjà traversée stoppant et diffractant ces derniers. La température, l'indice de réfraction du milieu de montage et de la matrice extracellulaire sont autant de facteurs supplémentaires qui contribuent à cette dégradation. Comme il est nécessaire d'assurer une certaine qualité de la première image à la dernière pour une bonne reconnaissance par traitement informatique, il convient de chercher une autre solution.

#### Points à respecter pour le montage à concevoir

La papille folliculaire est un tissu conjonctif<sup>6</sup>, donc lâche et surtout fragile à la manipulation. Selon le cycle pileux (c.f. 'Cycle pileux', page 4), elle peut être plus ou moins adhérente, dû à un changement de composition de la matrice extracellulaire. Pour toutes ces raisons, les manipulations sur la papille folliculaire ne peuvent être qu'indirectes. Le meilleur moyen d'y parvenir est par adhérence et transport via de fines lamelles en verre.

6. Tissu dont les cellules sont séparées par une matrice extracellulaire. Par opposition au tissu épithélial, où les cellules sont jointives





**FIGURE 5.3 – Processus d'extraction de la papille folliculaire**

Les joues de l'animal sacrifié sont découpées soigneusement à l'aide de ciseaux de microdissection. Les vibrisses sont ensuite mises à jour en déchirant le tissu conjonctif avec la pointe d'une pince, par la face interne de la joue. Les vibrisses en position  $a_3$  et  $a_4$  (c.f. figure 1.1, page 2) sont ensuite prélevées en les saisissant au-dessus du renflement (c.f. 'Le follicule pileux', page 3). La capsule est alors retirée, la papille extraite et marquée avec le *DRAQ5<sup>TM</sup>*.

Le montage<sup>7</sup> des échantillons à destination du microscope peut se faire de deux manières, à savoir sur lame ou dans une boîte de Pétri. En fonction du type d'échantillon, d'objectif (à air ou à immersion), ou simplement du microscope (droit ou inversé)<sup>8</sup>, on préférera l'un ou l'autre. Du fait de sa fragilité, le montage doit respecter certains points, afin de garantir son intégrité et prévenir sa dessiccation :

1. le milieu de montage doit rester liquide, i.e. ne pas durcir, ne pas sécher
2. l'échantillon doit rester immobile, mais sans utiliser de points d'ancrage
3. dans le cas du montage sur lame, un certain espacement doit être garanti, pour éviter l'écrasement de l'échantillon

L'utilisation d'une boîte de Pétri est impossible car on ne peut garantir l'immobilité de l'échantillon, celui-ci ayant une tendance naturelle à flotter. De plus, les objectifs à immersion eau ont une résolution inférieure à ceux de type glycérol ou huile, utilisables avec les montages sur lame.

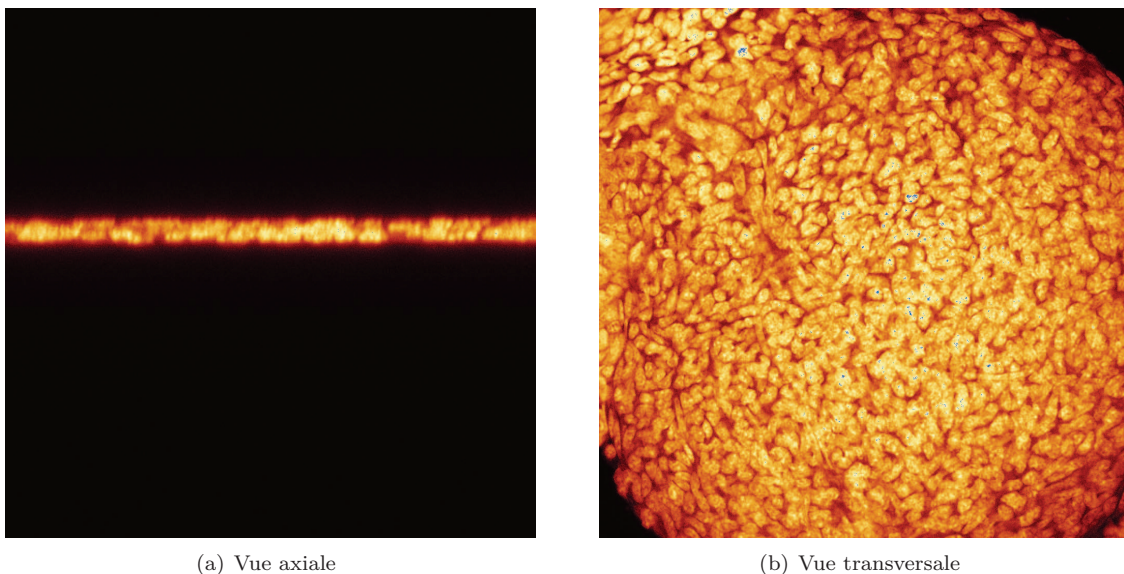


FIGURE 5.4 – **Papille folliculaire dans un montage conventionnel sur lame**

Sans espacement prévu entre le coverslip et la lame de support, la papille se retrouve irrémédiablement aplatie et le champ de vision devient même trop restreint pour que l'on puisse acquérir d'image. Marqueur nucléaire, *DRAQ5<sup>TM</sup>*.

Le montage sur la lame est par contre possible, pour autant que l'on évite l'écrasement de l'échantillon. En effet, celui-ci est habituellement déposé sur une lame d'histologie et recouvert par une fine lame d'exactement  $170 \mu\text{m}$  d'épaisseur, le *coverslip*. On finalise le montage en ajoutant par capillarité le milieu de montage. Si pour des coupes de cerveau de rat ou des cultures de cellules cela ne pose pas de problème, il en va autrement pour la papille folliculaire qui se retrouverait ainsi écrasée. L'empilement des noyaux qui en résulterait rendrait alors impossible leur individualisation, et donc leur comptage (c.f. figure 5.4, page 32).

### Montage conventionnel avec espacement

Une solution fonctionnelle consiste donc à espacer le coverslip de la lame de support. Ceci peut être réalisé en superposant trois couches d'adhésif simple face pour garantir suffisamment de hauteur sans

7. Support présentant l'échantillon au microscope, sa préparation correcte est très importante pour la qualité du résultat final de l'acquisition

8. Objectif venant par dessus ou par dessous l'échantillon

pour autant laisser trop d'espace entre le coverslip et la papille<sup>9</sup>. Cette astuce donne de bons résultats sur de petits échantillons (c.f. figure 5.5, page 34), mais reste encore insuffisant pour des échantillons plus grands de quelques dizaines de microns. Comme la question biologique nécessite le prélèvement à des points temporels où les échantillons sont plus importants en taille que les papilles de test (début de la phase anagène), il est donc nécessaire de réfléchir à un système qui couvre en qualité toutes les tailles d'échantillons possibles pour les expériences, de manière à être consistant et homogène.

### Vers un montage pour une acquisition *recto-verso*

La papille folliculaire est une structure sphérique et donc symétrique. D'après les tests déjà réalisés, la qualité peut être assurée au minimum jusqu'à la moitié du volume. En partant de l'hypothèse que l'on puisse scanner des deux côtés de la papille, on obtient ainsi deux volumes à partir des deux « hémisphères » constituant la papille (c.f. figure 5.6, page 35). Sachant qu'il existe des techniques informatiques de traitement d'images rendant possible l'alignement et la fusion des volumes entre eux, la solution à trouver réside par conséquent en un montage dont l'acquisition puisse être réalisée des deux côtés de notre échantillon, face *recto* puis face *verso*.

Dans un montage conventionnel sur lame, l'objectif vient du côté du coverslip, qui, et c'est très important pour le type d'objectif utilisé, doit mesurer exactement 170  $\mu\text{m}$  d'épaisseur en tous points<sup>10</sup>. Scanner des deux côtés requiert par conséquent que le montage comporte des coverslips de part et d'autre de l'échantillon, et donc que l'on remplace la lame histologique par un autre support.

Partant de ces constatations, le montage suivant a été imaginé et conçu (c.f. figure 5.7, page 35) : deux coverslips séparés par un élément d'une certaine épaisseur, constituant une chambre dans laquelle pourra se trouver l'échantillon, immergé dans un liquide de montage adéquat. L'ensemble se trouve ensuite fixé sur un support fenêtré, autorisant le passage de l'objectif lors de l'acquisition côté *verso*. Le support, afin d'être un maximum immobile pendant les acquisitions, est conçu pour épouser la forme de la platine.

Pour des questions de reproductibilité, il a été découpé en série dans des plaques de PET (Vivak PetG), matière qui a l'inconvénient d'être sensible du point de vue de la dilatation aux variations de température. Le contrôle de la température est donc un élément de réussite important, notamment pour ce point précis. L'espacement est assuré par de l'adhésif double face de 130  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pré-découpé à l'aide d'une table de traçage. L'avantage incomparable de la double face autocollante réside dans une fermeture hermétique de la chambre aux points d'adhérence des coverslips. Cela comporte également le bénéfice d'éviter que le vernis<sup>11</sup> servant à sceller le tout ne fasse varier la hauteur de l'espacement en s'infiltrant entre l'adhésif et les coverslips.

Le montage étant à usage unique, il doit dès lors être produit à chaque nouvel échantillon. L'intérêt du système réside dans sa relative simplicité de construction, ce qui facilite sa réalisation pour un grand nombre d'exemplaires.

### 5.1.5 Amélioration de la qualité d'acquisition

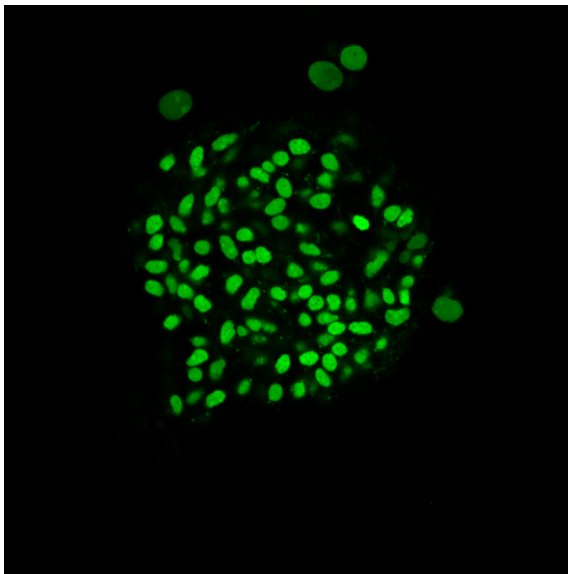
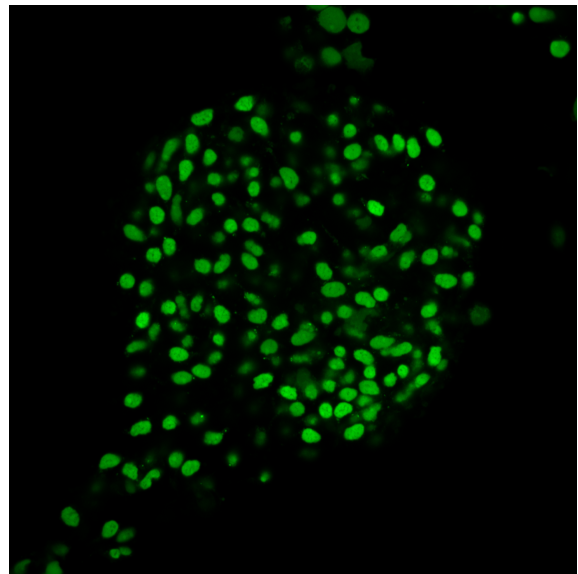
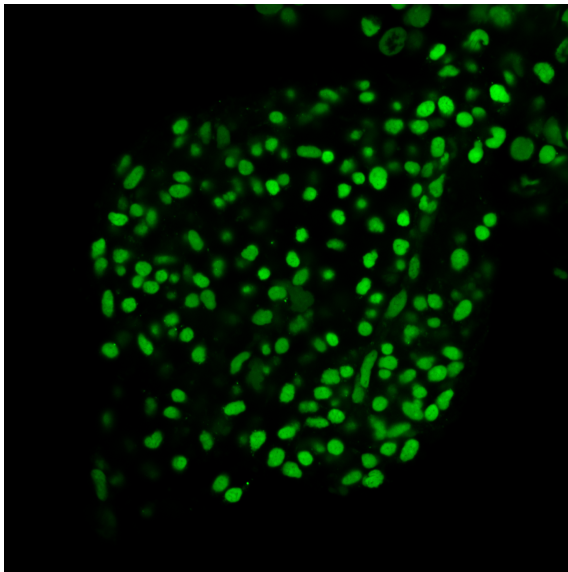
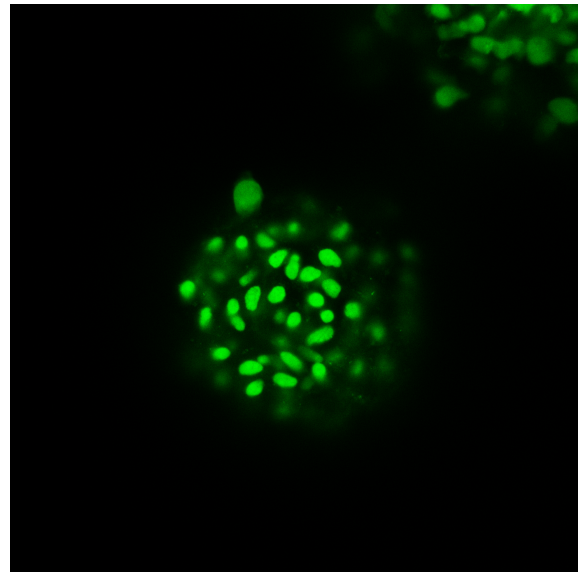
Les traitements informatiques de déconvolution, recalage et comptage s'effectuant sur les images acquises au microscope confocal, la qualité de ces dernières constitue un critère essentiel. Les images doivent idéalement avoir un bon contraste (rapport signal/bruit élevé), une bonne résolution et une bonne homogénéité lumineuse sur l'ensemble des sections optiques de l'échantillon<sup>12</sup>.

9. Si l'espace devient trop important, on rencontre des problèmes dus à la diffraction du milieu et à la distance de travail de l'objectif

10. Les objectifs sont dessinés pour tenir compte de la déviation de la lumière d'illumination et d'émission au travers d'une lame de verre d'une épaisseur spécifique

11. Le vernis est couramment utilisé sur les montages destinés à la microscopie pour éviter l'évaporation du milieu de montage et stabiliser l'ensemble

12. Pas de variations d'intensité selon la profondeur d'acquisition

(a) profondeur 28  $\mu m$ (b) profondeur 46  $\mu m$ (c) profondeur 69  $\mu m$ (d) profondeur 135  $\mu m$ **FIGURE 5.5 – Acquisition entière de l'échantillon**

Papille en début de phase anagène (c.f. 'Cycle pileaire', page 4). Montage conventionnel sur lame, modifié en ajoutant une hauteur d'adhésif entre le coverslip et la lame d'histologie dans le but d'éviter un écrasement de l'échantillon. Marqueur : *DRAQ5<sup>TM</sup>*.

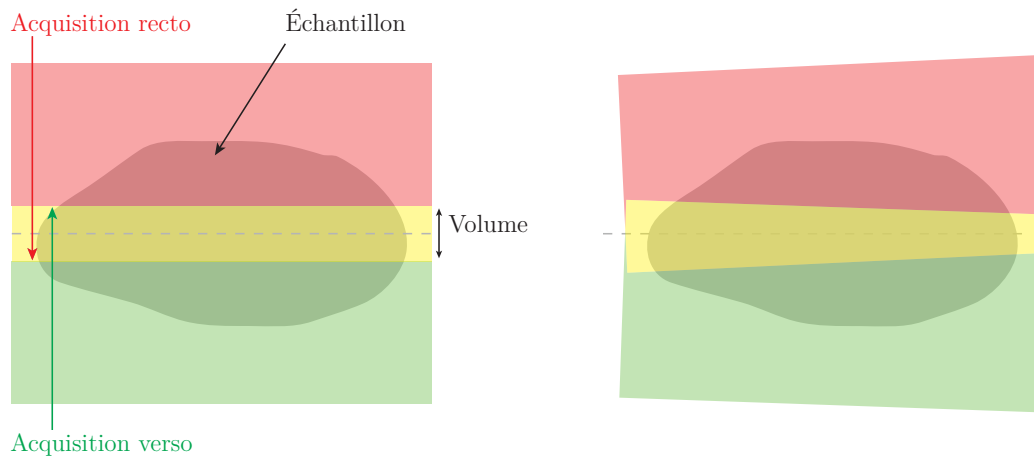


FIGURE 5.6 – Principe de l'acquisition *recto-verso*

Le principe de l'acquisition consiste à acquérir un premier côté de l'échantillon (face *recto*, en rouge), de l'extérieur vers l'intérieur, jusqu'à une profondeur un peu plus distante que le milieu de l'échantillon. On procède de la même manière de l'autre côté de l'échantillon (face *verso*, en vert), obtenant ainsi au final deux piles d'images dont les volumes ainsi constitués comportent un sous-volume commun (en jaune), utilisé pour le recalage. Dans un cas idéal, les plans d'acquisition sont parallèles entre les deux acquisitions (schéma de gauche), mais en réalité, il n'en est rien (schéma de droite). Le recalage informatique devra ainsi être effectué en translations tridimensionnelles, mais également en rotations dans l'espace.

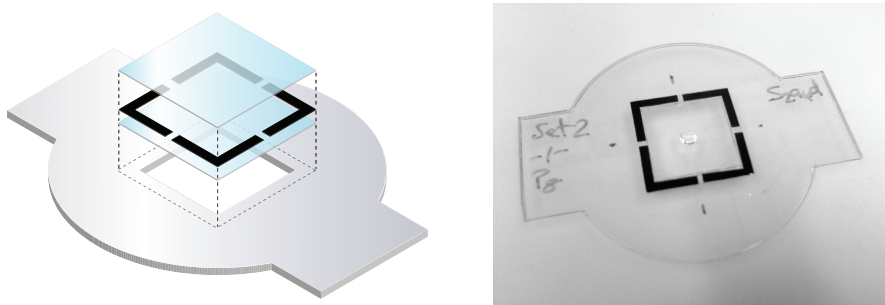


FIGURE 5.7 – Schéma et photo du montage

Un premier coverslip est collé au support à l'aide de colle cyanolite. Parallèlement, l'adhésif double face prédécoupé est apposé sur le deuxième coverslip. Une fois l'échantillon déposé sur le premier coverslip, on dépose délicatement le deuxième coverslip, avec le scotch dirigé vers le support. On remplit ensuite de PBS 1x la chambre constituée par les coverslips grâce aux ouvertures dans le scotch prévues à cet effet et on finalise le montage en scellant avec du vernis.

En microscopie, les meilleurs réglages théoriques ne donnent pas forcément les meilleurs résultats à l'acquisition. En réalité, il est bien plus souvent question de compromis, chaque cas d'acquisition comportant ses propres particularités. Adapter ses réglages en fonction du système biologique étudié, des spécificités des manipulations à l'expérimentation et de la finalité est donc primordial pour obtenir les meilleurs résultats. Les réglages présentés ci-dessous ont été choisis d'après mes discussions avec les membres de la plateforme d'imagerie de la Faculté des Sciences de la Vie (BIOP, Dr N. Garin) et selon ces ouvrages de référence [22, 25, 24, 23].

### Qualité optique

**Température** Elle a un effet tout d'abord au niveau du microscope, du fait de la dilatation des composants. Ensuite, elle influence optiquement la pièce centrale du microscope, l'objectif. En effet, les construc-

teurs conçoivent leurs objectifs pour des températures d'utilisation bien spécifiques : un objectif corrigé<sup>13</sup> pour une utilisation à 37 ° C pour l'imagerie du vivant (« live cell imaging ») ne doit donc idéalement pas être utilisé à température ambiante par exemple.

Enfin, elle joue un rôle important au niveau du montage, du fait du matériau constituant le support. Le PET étant très sensible à la température, des variations de température de 0.2-0.3 ° C se traduisent en mouvements visibles sur les images, plus particulièrement dans la direction axiale au niveau de la constance du pas entre les coupes optiques.

Pour se préserver de variations de température pendant l'acquisition, le microscope est maintenu à température constante dans une chambre thermorégulée. La salle contenant le microscope comportant des variations de température, il est préférable de fixer la température de la chambre plusieurs degrés au-dessus de la température ambiante. Cette température a été fixée à la valeur médiane de 30 ° C, les températures idéales de fonctionnement des objectifs glycérol 20x et 63x se situant respectivement à 22 ° C et 37 ° C.

**Milieu de montage** Dans un cas idéal, le milieu de montage doit avoir un indice de réfraction égal à celui du coverslip, à savoir celui du verre. Or les milieux s'en approchant sont relativement visqueux : le fluide se répartit très mal dans la chambre contenant l'échantillon et leur viscosité favorise la formation de bulles d'air au contact de la papille. Celles-ci constituant un changement de milieu supplémentaire, elles sont donc absolument à éviter.

Après de multiples tests, le milieu finalement retenu est le PBS 1x. Même si l'indice de réfraction  $n_{PBS}$  de 1.33 est relativement éloigné des 1.51 du verre, les résultats obtenus en terme de qualité d'image et de facilité de manipulation se sont révélés satisfaisants. Côté manipulations, la conservation, le transfert sur lame et le remplissage se font ainsi tous avec le même milieu. De plus, la papille folliculaire ayant été transférée sur coverslip dans une goutte de PBS, lors du remplissage final, la jonction des deux liquides se fait naturellement, évitant ainsi la formation d'une bulle d'air.

**Choix de l'objectif** Parmi les objectifs à air, eau, glycérol ou huile, le choix s'est porté sur ceux à glycérol pour des raisons de résolution optique, de distance de travail, de disponibilité de grossissement, de température d'utilisation ou de compatibilité avec la durée des expériences. Les objectifs à eau ont notamment été écartés pour des questions de durée d'acquisition, la moyenne d'acquisition de 2 h pour un seul côté posant des problèmes d'évaporation consécutive du milieu d'immersion de l'objectif.

Deux objectifs glycérol corrigés à grossissements différents — un 20x (*Leica 0.7 HC PL APO CORR lbd.Bl*) et un 63x (*Leica 1.3 HCX PLAPO CORR 37*) — ont été utilisés. Cette hétérogénéité dans les grossissements utilisés s'explique par le fait que sur les premières acquisitions le 63x était utilisé préférentiellement au 20x à cause de son pouvoir de résolution optique supérieur. Les tailles d'échantillons variant au fur et à mesure de l'expérimentation, le 20x a été progressivement privilégié, pour finalement être le seul objectif employé, afin de garantir une certaine homogénéité au niveau du grossissement.

En définitive, l'emploi du 63x ne constitue pas un avantage par rapport au 20x. La résolution latérale supérieure n'apporte pas un plus significatif pour la détection des noyaux. La résolution axiale, quant à elle, est compensée dans le cas du 20x par le travail remarquable effectué à la déconvolution. En effet, pour chaque image du volume, les noyaux n'appartenant pas au plan focal de la coupe optique sont fortement atténués, améliorant de ce fait la discrimination axiale. De plus, selon la taille de l'échantillon, la distance de travail<sup>14</sup> de l'objectif n'est pas suffisamment grande. Cela a deux conséquences possibles : les images deviennent floues en dehors de la zone de focus, voir l'objectif finit par toucher le coverslip,

13. Objectif modifié par le fabricant pour tenir compte de conditions liées à une utilisation particulière. Ici corrigé pour une température différente de la température ambiante

14. Distance sur laquelle l'image est nette. Celle du 63x est de 200  $\mu m$  contre 2500  $\mu m$  pour le 20x

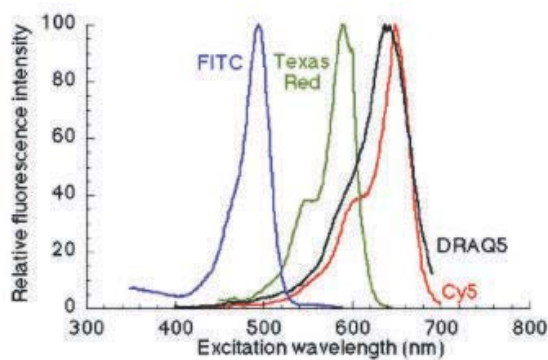
rendant par là-même inutile l'acquisition<sup>15</sup>.

**Atténuation du problème de diffraction** Les objectifs à glycérol 63x et 20x comportent une bague de réglage. Cette bague sert à adapter l'objectif à l'indice de réfraction du milieu d'immersion. Dans le cas du 20x, cette bague permet par exemple de choisir le type de milieu d'immersion de l'objectif, le modèle employé ayant la particularité d'être utilisable également avec de l'eau ou de l'huile. Dans notre cas, l'intérêt de cette bague réside dans la possibilité de pouvoir diminuer le problème de diffraction en l'ajustant de manière optimale notamment par rapport aux changements d'indices de réfraction des milieux traversés. En effet, en se positionnant à la hauteur du coverslip en vue  $xz$  et en mode réflexion, on peut ajuster la bague de sorte à ce que la lame apparaisse le plus nettement possible. Cette netteté garantit ainsi la meilleure adaptation possible de l'objectif aux conditions d'observation.

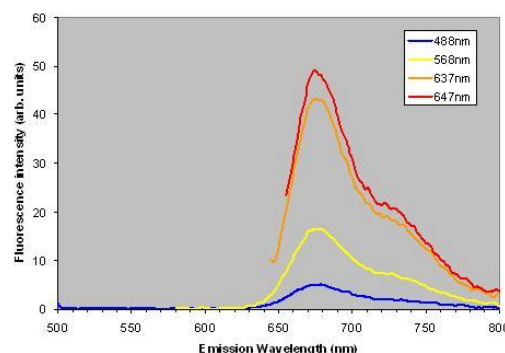
### Qualité d'illumination et d'émission

**Puissance laser** La puissance du laser est un élément important du pouvoir de pénétration dans les tissus. Si l'intensité du laser est trop faible par rapport à l'épaisseur du tissu à balayer, la profondeur d'acquisition en est diminuée. A l'inverse, si elle est trop forte, dans le cas d'acquisition de tissu vivant, le laser peut non seulement être destructeur pour les cellules, mais également pour le fluorophore (photobleaching).

Les échantillons étant fixés dans notre cas et le marqueur *DRAQ5*<sup>TM</sup> étant particulièrement résistant, il est possible de pousser la puissance du laser 633 nm à des pourcentages de puissance totale à éviter en tant normal. Le 633 est le laser le plus lointain dans le spectre à disposition sur le microscope confocal. Bien que sa longueur d'onde n'est pas idéale pour exciter le *DRAQ5*<sup>TM</sup> (c.f. figure 5.8, page 37), il est cependant le plus proche de la longueur d'onde d'excitation optimale.



(a) Amplitude d'excitation selon  $\lambda_{laser}$



(b) Amplitude d'excitation selon le laser utilisé

### FIGURE 5.8 – Courbes d'excitation du *DRAQ5*<sup>TM</sup>

En fonction du laser utilisé, le pic d'excitation du marqueur sera plus ou moins important. D'après les caractéristiques fournies par le fabricant, la longueur d'onde d'illumination optimale se situe à 647 nm. *Illustration : Biostatus Limited*

Afin d'exploiter au mieux la puissance du laser, la méthode mise au point a été, étant donné un plan de coupe optique choisi, d'augmenter la puissance du laser jusqu'à constater que l'augmentation n'apporte plus visuellement d'amélioration. Ce pourcentage a été établi sur plusieurs échantillons de tests et finalement diminué de 10%. La valeur retenue (75%) a été ensuite réutilisée pour toutes les acquisitions des échantillons des différents points temporels.

15. Déplacement de l'échantillon sur les images

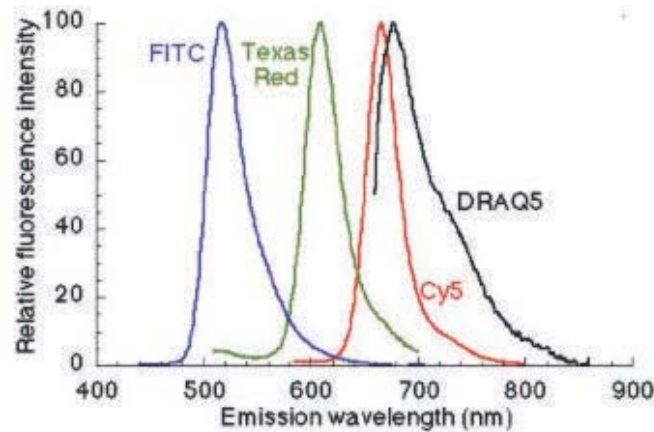


FIGURE 5.9 – Courbe d'émission du *DRAQ5<sup>TM</sup>*

La courbe d'émission du *DRAQ5<sup>TM</sup>* comporte un pic d'émission à 670 nm et couvre une bande spectrale allant jusqu'à environ 860 nm. Ce marqueur est donc également très intéressant en utilisation avec d'autres fluorochromes, car le décalage dans les rouges lointains de sa courbe d'émission limite fortement le risque de chevauchement avec les courbes des autres fluorophores. *Illustration : Biostatut Limited*

Une des conséquences de la puissance laser élevée réside, outre l'augmentation de la profondeur d'acquisition, dans un bruit de fond plus faible au niveau des images. Cela est dû au fait que le voltage à appliquer aux photomultiplicateurs est nettement plus bas : si l'intervalle de voltage se situe habituellement entre 700 (V) et 900 (V), dans notre cas elle ne dépasse pas les 400 (V). L'augmentation de la puissance du laser améliore ainsi le contraste dans les images.

**Filtrage dans la bande passante en émission** Le microscope confocal utilisé pour les expériences est un Leica SP2 AOBS inversé. Un des gros avantages de ce microscope consiste en sa flexibilité multispectrale. En d'autres termes, il est possible de pouvoir récupérer avec les PMTs, simultanément ou séquentiellement, plusieurs longueurs d'ondes émises par plusieurs fluorophores excités. La sélection des bandes spectrales d'intérêt se fait avant la photomultiplication à l'aide d'un système de miroirs coulissants.

Dans notre cas présent, l'emploi d'un seul marqueur fluorescent simplifie le réglage de l'ouverture de l'unique photomultiplicateur utilisé. En effet, il n'y a pas à se soucier de chevauchements éventuels des courbes d'émissions de deux ou plusieurs fluorophores (c.f. figure 5.9, page 38). La bande spectrale d'émission sélectionnée n'est ainsi limitée dans sa borne supérieure que par la capacité du microscope à récupérer les longueurs d'ondes élevées, et dans sa borne inférieure par la présence de la ligne du laser utilisé pour l'illumination. Concernant ce point, la borne inférieure est déterminée de manière empirique, en fonction de la longueur d'onde du laser utilisé (c.f. table 5.1, page 39). Dans notre cas, elle est située à 650 nm, soit un peu plus de 15 nm au-dessus des 633 nm du laser rouge lointain.

**Pinhole** Le pinhole est responsable de la discrimination axiale, en coupant la lumière hors-focus. Sa taille est fixée en « airy unit » (AU). Une règle d'or établie pour son réglage consiste en une aire de 1 AU pour obtenir une bonne résolution. Ce n'est cependant pas une règle immuable : en fonction de ses besoins, on peut la faire varier soit pour avoir plus de lumière, soit pour gagner en résolution. Par exemple, si on peut sacrifier la résolution en z en ouvrant le pinhole (airy plus grande donc), on recevra plus de lumière d'émission. En conséquence, on pourra scanner plus rapidement et on aura éventuellement moins de bruit de fond, et peut-être même une résolution meilleure.

Leica travaille avec un seul pinhole optimisé pour les longueurs d'ondes moyennes. L'airy unit ainsi proposé est calculé pour une lumière d'illumination de 594 nm. Ce détail n'était pas connu au début des acquisitions, qui ont été ainsi effectuées avec cette valeur, mais avec une longueur d'onde d'illumination



$\lambda_{excitation}$	$\lambda_{ouverture}$	$\lambda_{fermeture}$
405 nm	410 nm (+5 nm)	478 nm (-10 nm)
488 nm	498 nm (+10 nm)	551 nm (-10 nm)
561 nm	571 nm (+10 nm)	618 nm (-15 nm)
633 nm	648 nm (+15 nm)	840 nm

TABLE 5.1 – Ouvertures et fermetures des PMTs conseillées en fonction des lasers

Le positionnement des miroirs coulissants relativement aux longueurs d'ondes des lasers employés se détermine de manière empirique. Plus la longueur d'onde du laser est élevée, et plus l'écart entre la longueur d'onde et le positionnement du miroir est élevé.

de 633 nm. La taille de pinhole ainsi fixée correspond à une valeur inférieure à 1 AU pour le laser employé, conduisant à un gain en résolution pour une perte de lumière qui ne semble pas défavorable. Vérification faite auprès d'un technicien de Leica, une valeur de 0.8 AU résulte en une perte de lumière raisonnable, pour un gain de résolution plutôt correct.

### Qualité d'image

**Profondeur de codage** La profondeur de codage correspond au nombre de bits<sup>16</sup> utilisés pour représenter une intensité dans l'image. Le nombre de valeurs possibles (combinaisons) codables est de  $2^8 = 256$  avec 8 bits et  $2^{12} = 4096$  avec 12 bits. En conséquence, on est capable de représenter plus de niveaux d'intensité différents avec 12 bits qu'avec 8. Sur l'ensemble des intensités de fluorescences détectées, on peut attribuer plus de valeurs différentes avec un nombre de bits plus élevé, et ainsi avoir plus de nuances dans les intensités. La contrepartie réside dans des images prenant plus de place en termes de stockage, chaque valeur comportant 4 bits de plus.

Le logiciel d'acquisition du microscope rendant possible l'acquisition sur 8 ou 12 bits, une profondeur de codage 12-bit a été choisie, la déconvolution tirant notamment parti d'une plus grande palette d'intensités codées.

**Taille de voxel** La taille des voxels<sup>17</sup> joue un rôle important. En effet, les opérations de déconvolution et de comptage nécessitent une certaine taille pour garantir un traitement optimal. Ces valeurs sont présentées dans le tableau ci-contre à titre d'information :

À la lecture du tableau, on peut constater qu'outre les caractéristiques de l'objectif (milieu d'immersion, grossissement, ouverture numérique), cette taille dépend de la résolution en nombre de pixels des images et de la valeur du zoom du scanner. Une résolution faible en nombre de pixels (e.g. 512x512) nécessite un zoom plus important qu'une résolution élevée (e.g. 2048x2048), au prix d'une réduction du champ de vision supplémentaire.

Quelle que soit la résolution donc, un zoom est indispensable. Étant donnée une taille de voxel préconisée fixe, le zoom et le champ de vision qui en résulte déterminent le choix de la résolution en pixels. Le nombre de pixels ayant un impact direct sur le temps d'acquisition, il est donc important de pouvoir obtenir le zoom le plus grand possible tout en ayant un champ de vision qui comprend l'échantillon (ou du moins la partie que l'on souhaite acquérir).

16. Unité d'information en informatique, représentée par les chiffres 0 ou 1. Les valeurs sont donc représentées en base 2, par opposition à la base 10 utilisée communément (chiffres 0 à 9)

17. Un pixel est le plus petit élément composant une image (= un point de l'image). Le voxel est l'équivalent pour un volume (un « pixel en 3D »)

Objectif	$N_A$	Pixels	Bitplane Imaris 2006 (3D)			SVI Huygens (déconvolution)		
			Zoom	Champ	Voxel xy/z (nm)	Zoom	Champ	Voxel xy/z (nm)
20x	0.7	512	8	92	180 / 700	16.8	44.5	87 / 677
		1024	4	184		8.4	89	
		2048	2	378		4.2	178	
63x	1.3	512	4.8	49	97 / 156	10	23.6	46 / 153
		1024	2.4	100		5	47	
		2048	1.2	200		2.5	94	

TABLE 5.2 – Tailles de voxels recommandées (1 AU,  $\lambda_{em} = 505 \text{ nm}$ )

Les tailles répertoriées ici sont valables pour un pinhole de taille 1AU pour une longueur d'onde d'émission  $\lambda$  de 505 nm et sont présentées à titre d'information. En effet, pour nos conditions d'acquisition, elles nécessitent d'être recalculées (c.f. table 5.3, page 40). Le milieu de montage a été fixé à 1.4<sup>19</sup> pour le logiciel de déconvolution *SVI Huygens*<sup>TM</sup> et à 1.33 pour le logiciel de reconstruction *Bitplane Imaris*<sup>TM</sup> (valeurs fournies en 2006). Le zoom et la taille de champ de vision ont été déterminés expérimentalement, relativement à la taille de voxel théorique optimale calculée. *Données : Thierry Laroche, EPFL/SV/BIOP*

Objectif	$N_A$	Résolution pixels	Voxel xy/z (nm)	
			Imaris	Huygens
20x	0.7	2048	239 / 841	113 / 885
63x	1.3	2048	129 / 160	60 / 198

TABLE 5.3 – Tailles de voxels recalculées ( $\lambda_{em} = 670 \text{ nm}$ )

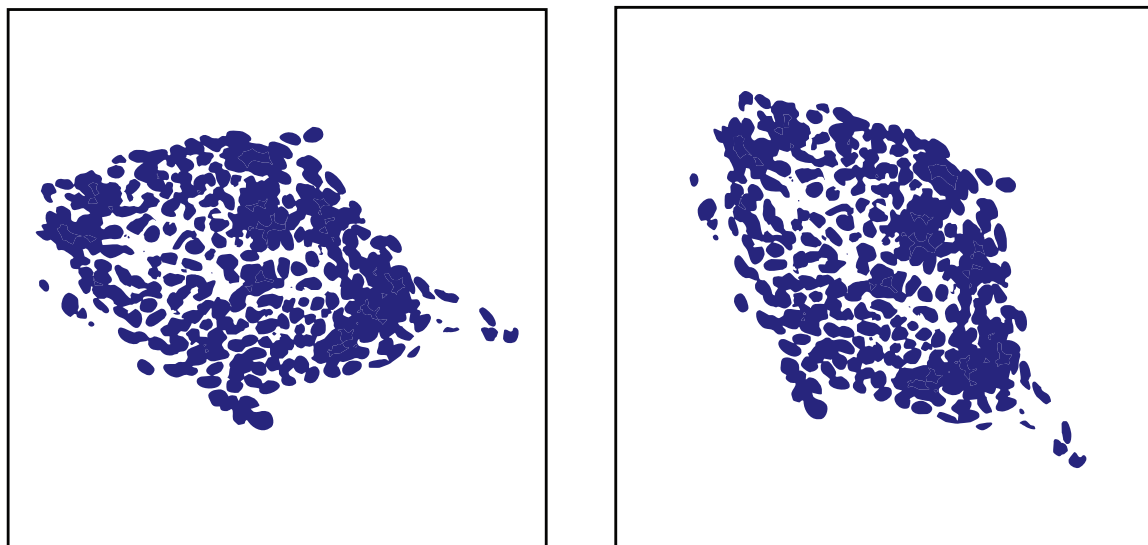
Les tailles de voxels ont été recalculées pour la reconstruction avec les équations utilisées par Bitplane pour son logiciel Imaris (c.f. equation 7.1, page 89). Pour la déconvolution, les valeurs ont été recalculées avec le calculateur disponible sur la page internet du Wiki du concepteur du logiciel *Huygens* (SVI).

Pour ce faire, une propriété de l'image découlant du théorème de Pythagore est exploitée, c'est-à-dire que la diagonale d'un carré est plus grande que son côté<sup>20</sup>. L'idée consiste à positionner l'échantillon à l'écran de telle manière à ce que la distance la plus grande à l'intérieur de celui-ci soit comprise dans la diagonale de l'image acquise (c.f. figure 5.10, page 41). La rotation est réalisée en tournant le champ de vision d'un angle compris entre  $-2^\circ$  et  $90^\circ$ .

Comme mentionné précédemment, les tailles recommandées de voxel pour la reconstruction et la déconvolution (c.f. table 5.2, page 40) sont calculées pour des réglages différents des nôtres. Afin de pouvoir les comparer entre elles, il est nécessaire d'ajuster ces valeurs pour nos conditions d'acquisition, à savoir une longueur d'onde d'émission de 670 nm et un milieu de montage PBS (c.f. table 5.3, page 40).

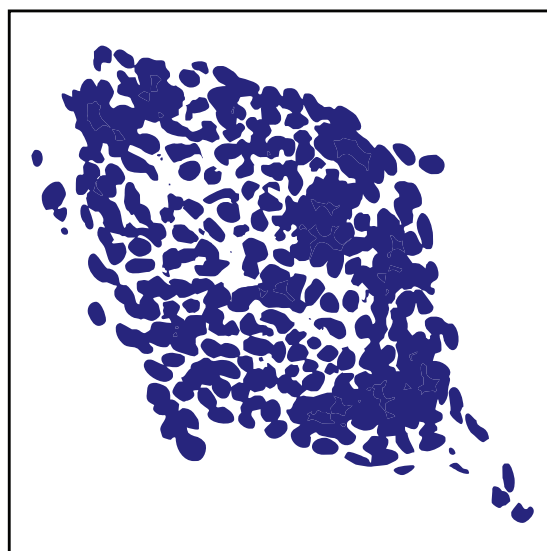
Dans la pratique, pour le glycérol 20x, le zoom possible est en moyenne de 3.4 pour une taille de voxel d'environ 110/644 nm. Quant au 63x, le zoom se situe habituellement autour de 1.2, pour une taille moyenne de voxel de 200/644 nm. S'il est possible de respecter les valeurs idéales avec l'objectif 20x glycérol, cela s'avère impossible dans le cas du 63x. Bien qu'il soit techniquement possible de réduire la taille du voxel (résolution de 4096x4096, pas d'avancement de 122 nm), la durée d'acquisition, beaucoup trop importante résultant de ces réglages, invalide cette solution (c.f. 'Durée d'acquisition', page 44).

20. Si  $c$  est la longueur de la diagonale et  $a$  la longueur du côté,  $c = \sqrt{2}a$



(a) Zoom sans rotation

(b) Zoom identique avec rotation



(c) Zoom plus important avec même rotation

### FIGURE 5.10 – Augmentation du zoom par rotation du champ de vision

La diagonale de l'image étant plus grande que le côté de l'image, on aligne la distance la plus grande dans l'échantillon sur celle-ci. Il est alors possible d'augmenter le zoom d'un certain ratio. A noter que la rotation est virtuelle et non physique : seul le champ de vision tourne, grâce à l'orientation en conséquence des miroirs. L'échantillon ne bouge pas et aucune perte de résolution n'est à déplorer.

L'impossibilité de pouvoir satisfaire ces requis explique donc l'abandon de cet objectif au profit du 20x glycérol (c.f. 'Choix de l'objectif', page 36).

Bien que la distance entre les coupes optiques puisse être d'un peu plus de 800 nm (c.f. table 5.2, page 40), une distance de 644 nm a été préférée. La raison de ce choix se situe au niveau des noyaux de la papille folliculaire : comme les plus petits d'entre eux peuvent avoir une taille de  $2.5 \mu\text{m}$ , cela garantit un minimum de trois coupes optiques par noyau, améliorant ainsi la détection lors de la reconstruction et donc le dénombrement.

Ces réglages illustrent ainsi parfaitement l'idée de prise de décision « micro - macro » au niveau du processus d'expérimentation (c.f. figure 5.1, page 28) : la nécessité d'effectuer des choix locaux en tenant

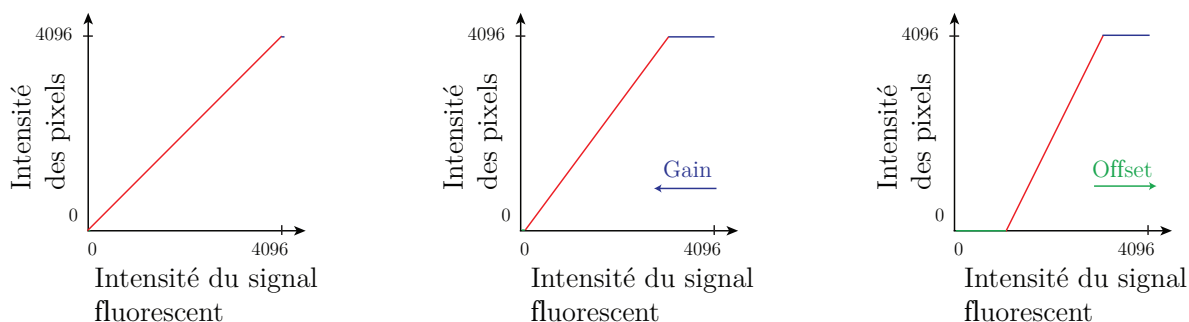


FIGURE 5.11 – **Intensité des pixels en fonction de la quantité de signal fluorescent**

Une augmentation du gain attribue plus d'intensités élevées de signal fluorescent à des pixels clairs ou saturés (bleus). Un relèvement du niveau de l'offset de son côté assigne plus d'intensités basses de fluorescences à des pixels sombres ou noirs (verts). Ces deux modifications contribuent ainsi à répartir la gamme des intensités de pixels possibles sur un intervalle réduit de fluorescences détectées. En résulte une image où de petites variations d'intensité de fluorescence conduisent à de grandes fluctuations d'intensité au niveau de l'image.

compte de la globalité du traitement, respectant certains critères techniques spécifiques au niveau des différents traitements mis en oeuvre tout en considérant leur finalité.

**Contraste** Lors de l'acquisition, le but recherché est de favoriser une information que l'on souhaite récupérer par rapport à une autre que l'on veut atténuer voir éliminer. Dans le cadre de notre expérimentation, on cherche à obtenir des noyaux bien lumineux et délimités, tout en éliminant un maximum le bruit de fond, de causes diverses<sup>21</sup>.

Le gain et l'offset sont deux réglages critiques allant dans ce sens, car ayant un fort impact sur le contraste dans l'image. Correctement réglés, de petites différences de signal se traduisent ainsi en de grandes différences d'intensité au niveau de l'image acquise, améliorant ainsi le contraste (c.f. figure 5.11, page 42).

Le gain permet de régler la sensibilité de détection de la fluorescence en augmentant ou diminuant le voltage des photomultiplicateurs. Une augmentation du voltage résulte en une augmentation de la photomultiplication et donc en une amplification du signal de fluorescence. Au niveau de l'image cela se traduit par une plus grande quantité de pixels ayant une valeur élevée. Le gain permet donc en pratique de fixer un seuil au-delà duquel les points de fluorescences ont une valeur d'intensité maximale dans l'image.

L'offset, ou *black level*, quant à lui rend possible de régler la sensibilité aux intensités de fluorescence basse. Une augmentation du niveau d'offset conduit à attribuer un plus grand nombre d'intensité de fluorescence basse à des pixels de faible intensité. L'offset permet donc d'ajuster le seuil en-dessous duquel les points de fluorescence ont une valeur considérée comme nulle dans l'image.

En pratique, plus le gain augmente, plus l'image devient lumineuse mais plus le bruit de fond est amplifié, tout en rajoutant un bruit électronique<sup>22</sup>. En ajustant correctement l'offset, on peut cependant atténuer cet effet. Ainsi, en relevant le seuil de l'offset et en abaissant le seuil du gain, on contribue à diminuer l'intervalle des intensités de signal détectés pour lui attribuer un maximum de niveaux d'intensités au niveau de l'image. Cela donne une image ayant un fond plus noir, faisant ressortir les détails recherchés.

21. Molécules de fluorochromes présentent de manière libre dans l'échantillon, flou résultant de la diffraction des rayons, éléments non nucléaires marqués

22. Résultant de l'augmentation du voltage des PMTs

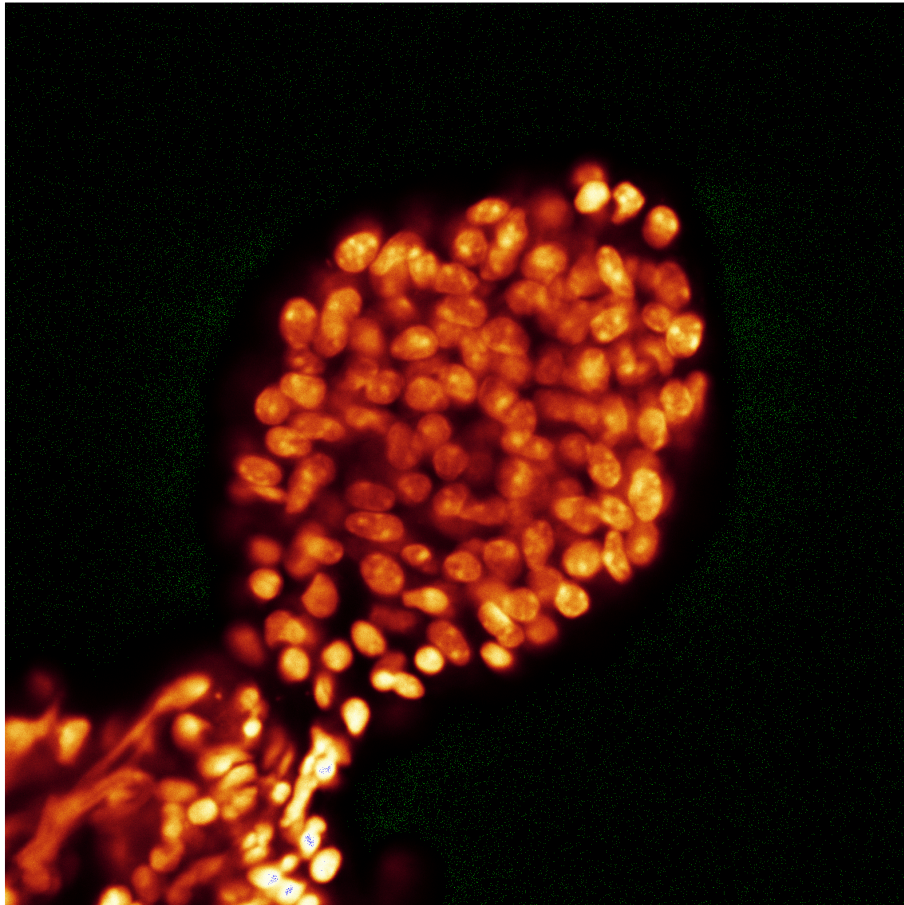


FIGURE 5.12 – Réglage du gain et de l'offset

Ces réglages se font habituellement à une profondeur se situant à peu près à la moitié estimée de l'échantillon. Le gain est réglé en premier, de telle manière à ce que quelques intensités seulement dans l'image soient à saturation (pixels bleus). Le niveau de noir est ensuite réglé de sorte que quelques points clairsemés soient mis à zéro (pixels verts). A noter que les réglages se font sur une acquisition en qualité d'acquisition (moyennage de 16 passages par lignes) et non en qualité de prévisualisation (1 passage par ligne).

Au fur et à mesure que l'on pénètre dans l'échantillon à l'acquisition, la luminosité des images décroît. Bien que le processus de déconvolution soit capable *a posteriori* d'améliorer grandement la qualité des images, il n'est pas capable, dans le cas d'images issues d'un microscope confocal, de compenser la perte de luminosité en fonction de la profondeur. La raison tient au fait que la PSF ( Point Spread function) (c.f. 'Déconvolution', page 46) pour ce type de microscope est habituellement très petite, du fait de l'emploi du pinhole. Ainsi, l'information intrinsèque de celle-ci n'est pas suffisante pour pouvoir compenser le manque de luminosité.

Sur le microscope *Leica SP2 inverted*, le gain peut être réglé à des valeurs différentes en des points de profondeur divers, fixés par l'utilisateur. On peut ainsi équilibrer la luminosité sur l'ensemble des images en augmentant le gain au fur et à mesure de la pénétration dans l'échantillon. Le logiciel de contrôle du microscope se charge de calculer les valeurs de gain entre les points fixés, de manière linéaire. L'offset, par contre, ne peut être modifié selon la hauteur d'acquisition. Par conséquent, il est réglé lors de chaque acquisition, pour nos expériences, au milieu de la papille folliculaire. Vu que le recalage des images résultant des acquisitions *recto* et *verso* s'effectue sur un volume commun situé à ce niveau, il est judicieux d'y garantir la meilleure qualité d'image possible à cette endroit dans l'échantillon.

Pour effectuer les réglages en évitant la saturation ou la sous-illumination, on choisit tout d'abord une table de couleurs<sup>23</sup> appropriée, la GlowUnder. Cette table permet d'avoir les intensités saturées en bleu et celles proches de zéro en vert (c.f. figure 5.12, page 43). On se positionne ensuite au milieu de l'échantillon pour y régler l'offset de manière définitive pour l'acquisition à venir. Pour ce faire, on commence d'abord par fixer le gain de sorte que seuls quelques pixels de l'image apparaissent bleus. Cela traduit une saturation de ceux-ci, c'est-à-dire qu'il n'est pas possible de leur attribuer des valeurs d'intensité plus élevée dans l'image. Une fois le gain réglé, on effectue le réglage de l'offset de telle manière à ce que seuls quelques pixels de l'image apparaissent verts. Cela correspond dans ce cas à des pixels dont l'intensité est nulle (c.f. figure 5.12, page 43).

L'offset ainsi fixé pour l'ensemble de l'acquisition, on effectue à nouveau le réglage du gain, mais en fonction de la hauteur d'acquisition. La démarche consiste donc à commencer à la profondeur maximale où l'on souhaite acquérir, pour revenir progressivement vers la surface de l'échantillon. Comme la profondeur diminue au fur et à mesure, on ajuste à la baisse le gain à chaque fois que l'on estime que l'image affichée à l'écran commence à comporter trop de pixels saturés.

### 5.1.6 Durée d'acquisition

Si le dédoublement des acquisitions (*recto* et *verso*) et la haute résolution des images apportent la garantie au final d'une bonne qualité d'image sur l'ensemble du volume reconstitué, elles ont cependant un impact important au niveau de la durée de temps d'acquisition pour un seul échantillon. Il s'agit donc de trouver un compromis entre la qualité minimale nécessaire et une durée d'acquisition « raisonnable ». La résolution en pixels des images ne pouvant être changée pour nos conditions d'expérimentation, les paramètres pouvant encore influencer la durée d'acquisition sont exposés ici.

Au final, pour une résolution de 2048x2048, la durée d'acquisition pour une seule image se situe aux environs de 45(s), soit de 1 h 30 à 2 h 30 pour une pile. Le dédoublement des acquisitions et le temps des réglages pour chacune des deux parties mènent finalement à une durée de 4 à 6 heures, pour un seul échantillon.

**Moyennage par ligne** Le moyennage par ligne (« line averaging ») représente le nombre de fois qu'une ligne du plan focal est parcourue par le laser. Le résultat de ces acquisitions multiples est ensuite moyenné, avant de passer à la ligne suivante.

23. La table de couleur indique quelle couleur doit être affichée en fonction de quelle intensité dans l'image

Le grand bénéfice qui résulte de ce mode d'acquisition se situe au niveau de la réduction du bruit de fond, le moyennage contribuant à fortement diminuer ce dernier. En découle un rapport signal/bruit grandement amélioré, et ainsi une résolution accrue. Un autre avantage de ce mode consiste en une moins grande sensibilité aux vibrations imprévues au niveau de l'image. Ce critère est à prendre en considération pour des acquisitions de longue durée.

La contrepartie réside en une durée de balayage directement proportionnelle au nombre de passages par ligne : un moyennage de seize lignes prendra ainsi quatre fois plus de temps qu'un moyennage de quatre lignes. Bien qu'un nombre de passage par ligne élevé contribue à rallonger le temps total d'acquisition, le gain de qualité et la réduction de bruit qui en découle en fait un paramètre des plus importants. Cela est particulièrement visible lorsque les images sont acquises à une profondeur importante dans l'échantillon. Pour cette raison, un réglage de seize passages par ligne a été adopté.

**Vitesse de balayage** La vitesse de balayage du scanner joue logiquement un rôle de premier plan dans la durée totale d'acquisition. Une vitesse de scanner plus élevée entraîne une réduction du temps global nécessaire, mais se fait au détriment d'un signal récupéré plus faible. Le bruit se révèle également plus conséquent du fait des intensités plus basses de fluorescence. Une augmentation de vitesse a donc pour conséquence une qualité d'image amoindrie pour une durée d'acquisition réduite.

Une baisse de la vitesse de balayage conduit à l'inverse à une augmentation de la qualité d'image, et à des niveaux de fluorescences plus élevés. Cependant, la durée d'illumination des molécules de fluorochrome augmentant, le fluorophore tend à se consumer plus rapidement.

La vitesse par défaut du microscope se situe à 400 Hz. En pratique, une fréquence de balayage plus importante augmente le bruit présent dans les images et réduit de manière conséquente la profondeur maximale possible d'acquisition. A l'inverse, un ralentissement de la vitesse constitue qualitativement parlant une moins bonne solution qu'une augmentation du moyennage par ligne. La vitesse de balayage est donc restée inchangée par rapport à la fréquence par défaut.

**Scan bi-directionnel et déphasage** Le balayage d'une ligne du plan focal par le scanner et la collecte de la lumière résultant de l'excitation se limite habituellement au trajet « allé » du scanner. Au retour, après changement de ligne, le laser est coupé afin d'éviter d'exciter trop le fluorochrome. Le balayage de la nouvelle ligne est ensuite effectué une fois le scanner situé de nouveau en début de ligne.

Sur les microscopes confocaux, il est possible de laisser actif le laser au retour, permettant ainsi l'acquisition de la nouvelle ligne par la même occasion. Avec cette astuce, la fréquence de balayage est doublée sans différence notable de qualité. En revanche, il convient de réajuster les lignes de l'image finale acquise, un décalage se produisant entre les lignes impaires scannées dans une direction et les lignes paires scannées dans le sens opposé. En effet, dans le mode de balayage unidirectionnel, une synchronisation est effectuée en chaque début de ligne, événement absent au retour de la nouvelle ligne.

En fonction du zoom appliqué, il est plus ou moins aisé d'appliquer une valeur de phase correcte. La meilleure manière d'y parvenir consiste à effectuer à la prévisualisation un zoom numérique<sup>24</sup> sur une région lumineuse, une valeur de 200 % permettant de vérifier si l'alignement est correct (c.f. figure 5.13, page 46). En cas de doute, deux acquisitions en pleine qualité permettront de départager deux valeurs de phase envisagées.

---

24. A ne pas confondre avec le zoom scanner, il s'agit d'un agrandissement en temps réel de l'image en acquisition

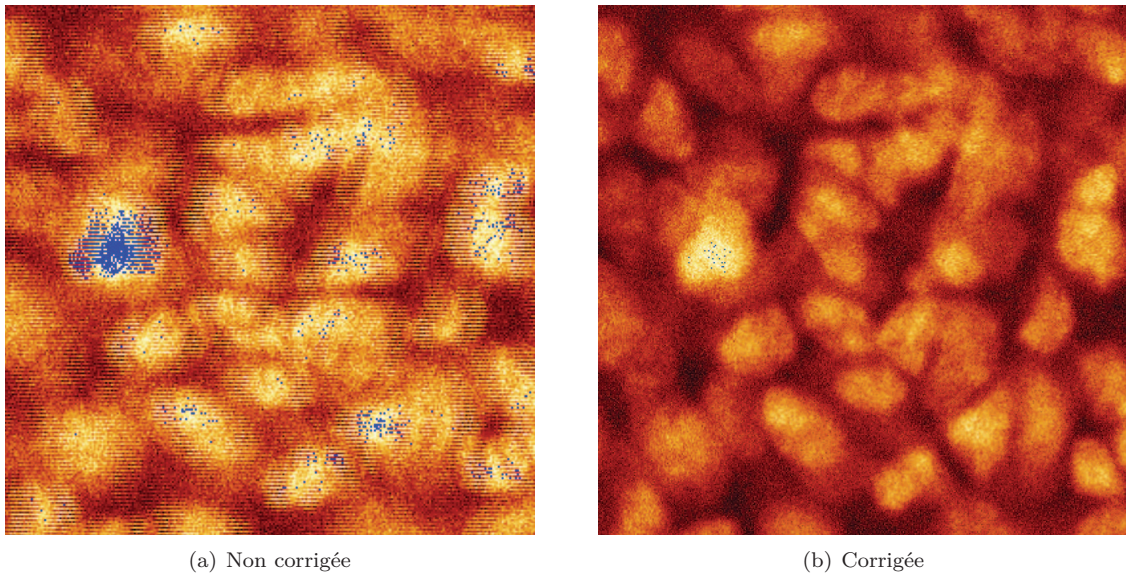


FIGURE 5.13 – Réglage de la phase

Lors d'une acquisition bi-directionnelle, les acquisitions dans chacun des deux sens ne sont plus synchronisées. Il en résulte ainsi un décalage entre lignes paires et impaires au niveau de l'image acquise. Ce déphasage peut être compensé en ajustant à la main la valeur de phase.

## 5.2 Traitement de l'information

### 5.2.1 Déconvolution

Le processus de déconvolution permet d'améliorer la netteté des images acquises. Il repose sur le principe selon lequel l'image finale obtenue avec le microscope est une image théorique de meilleure qualité qui aurait été déformée par un filtre. Ce filtre représente l'ensemble des distorsions dues notamment aux composants du microscope et aux différents milieux traversés. Ces déformations sont calculables de manière théorique et sont représentées par la PSF (« *Point Spread Function* »). En pratique, chaque point de l'image théorique est ainsi « convolué » avec la PSF, produisant un halo supplémentaire centré sur le point homologue dans l'image réelle. L'image finale que l'on obtient est ainsi moins nette et de résolution plus faible. La déconvolution est donc un calcul mathématique et physique sur les images acquises, permettant de restaurer une certaine netteté dans celles-ci (c.f. figure 5.14, page 47).

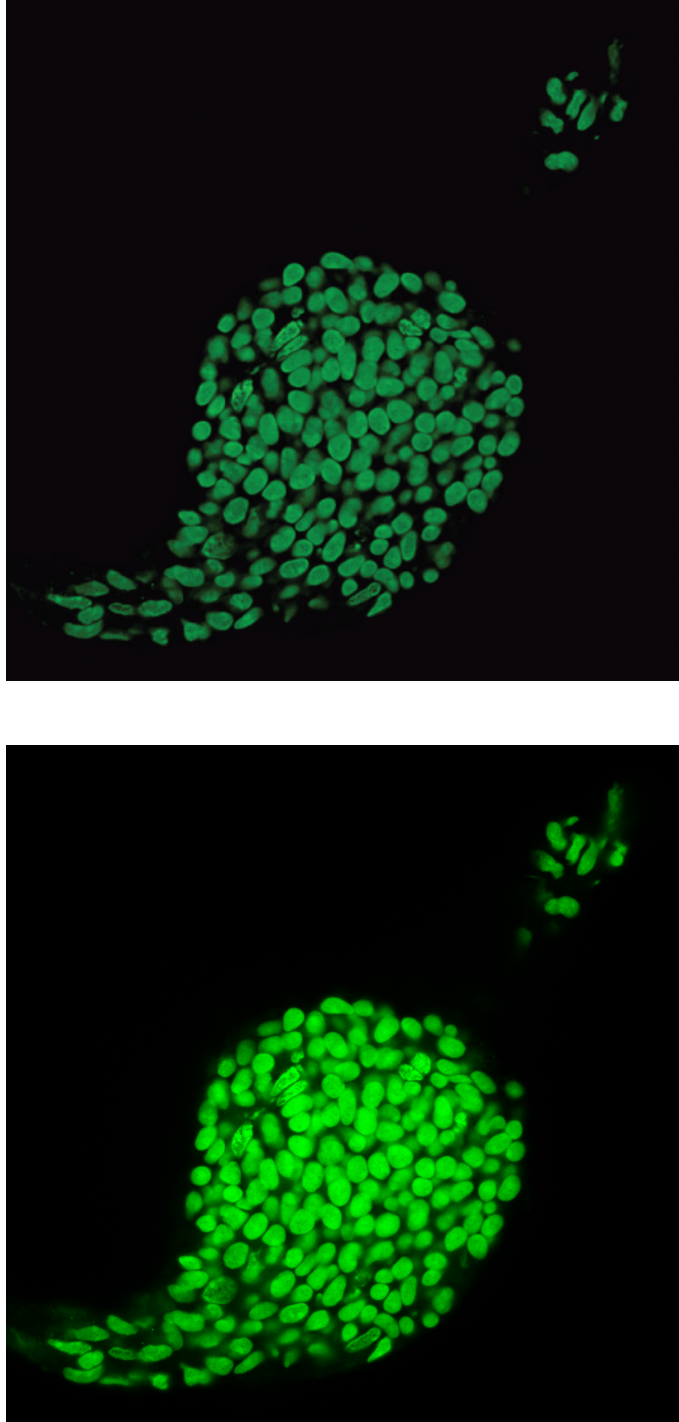
Outre les critères définis par les paramètres des images et les longueurs d'ondes d'illumination et d'émission, le critère qui varie et qui impacte le plus sur le résultat de la déconvolution est le ratio signal/bruit, déterminé par

$$SNR = \sqrt{\frac{i_{max} - i_{bkgr}}{i_{noise} - i_{bkgr}}} \quad (5.1)$$

Ce ratio indique au programme de déconvolution l'importance du bruit par rapport à l'image. Plus le ratio est élevé, plus la qualité de l'image est bonne.  $i_{max}$  correspond à l'intensité de pixel maximale rencontrée sur l'ensemble de la pile et  $i_{noise}$  l'intensité moyenne du bruit en fond d'image.  $i_{bkgr}$  correspond quant à lui à la valeur moyenne du fond de l'image. Ainsi, une surévaluation conduit à une image dont les détails sont fortement atténués tandis qu'une sous-évaluation tend à amplifier le bruit, car celui-ci est considéré comme du signal utile.

La méthode de déconvolution utilisée dans *SVI Huygens<sup>TM</sup>* est la *Classic Maximum Likelihood Estimation* (CMLE). Pour l'ensemble des images acquises, la valeur du ratio signal/bruit calculée est d'environ 15. Par comparaison, la moyenne des valeurs saisies au centre d'imagerie se situe à 8.





(a) Image originale

(b) Image déconvoluée

**FIGURE 5.14 – Amélioration de la résolution grâce à la déconvolution**

La déconvolution est une opération de traitement d'image visant à améliorer la qualité de l'image en tenant compte des dégradations dues aux éléments du microscope (objectifs, photomultiplicateurs...), aux milieux traversés par le laser et la lumière d'émission (milieu d'immersion, milieu de montage, coverslips...) et aux réglages du microscope (taille des voxels...).

### 5.2.2 Recalage des volumes d'images

Pour chaque échantillon acquis au microscope confocal, on dispose maintenant de deux piles d'images, face *recto* et face *verso*. Chacune des deux piles résulte d'une acquisition depuis l'extérieur de l'échantillon vers l'intérieur, jusqu'à une profondeur supérieure à que la moitié de l'échantillon (c.f. 'Vers un montage pour une acquisition *recto-verso*', page 33). De cette manière, on dispose d'un volume commun qui se retrouve à la fin de chacune des deux piles d'images. Ce sous-volume compris dans chaque pile peut ainsi être exploité pour aligner le volume *verso* sur le volume *recto*, le recalage des volumes se faisant sur celui-ci (c.f. figure 5.15, page 49). L'implémentation du recalage a été réalisée à l'aide de la librairie *ITK* ([www.itk.org](http://www.itk.org)).

#### Occupation de la mémoire et temps de calcul

La haute résolution et le grand nombre d'images posent problème pour le traitement. En effet, les calculs se faisant sur 64 bits à cause de la précision pour la métrique notamment, l'ensemble des images une fois chargée en mémoire occupent minimum 4 fois plus de place<sup>25</sup>. De plus, les opérations effectuées sur les images durant le processus de recalage utilisent également une quantité de mémoire additionnelle. Même avec une station de travail 64-bit gérant 16 Go de mémoire, la quantité mémoire demeure insuffisante : un essai sur une station SGI avec 300 Go de mémoire montrait une occupation de la mémoire de 22 Go pour deux piles de tailles moyennes (136 et 137 images chacune). Quand au temps de calcul, certaines piles n'avaient toujours pas de résultat 45h après le lancement des calculs.

Ainsi, pour diminuer le temps de calcul, le recalage des deux volumes est effectué selon le sous-volume commun. Par conséquent, seuls les sous-volumes concernés de chacune des piles contribuent effectivement au calcul de la mesure de similarité. Intuitivement, les images de chacune des piles qui n'ont pas de correspondance entre elles ne contribuent pas à la recherche de la transformation. Au niveau du calcul de la métrique, ces images n'ont donc pas d'influence, bien qu'utilisées pendant le calcul.

Limiter les calculs aux sous-volumes est donc une première approche pour améliorer l'efficacité. Ceci peut être réalisé au travers de masques en trois dimensions appliqués sur chaque volume avant les calculs. Si les opérations sont effectivement concentrées sur les sous-piles, la phase de conversion des images de 16-bit en 64-bit s'effectue toutefois toujours encore sur l'ensemble du volume, et non sur les portions nécessaires aux calculs. Le masque ne s'applique donc qu'aux calculs et non aux données, et si l'on constate toutefois un gain de rapidité dans les calculs, l'occupation mémoire reste problématique<sup>26</sup>.

Vu qu'il est impossible et improductif d'effectuer les calculs sur les piles entières, la solution retenue consiste à ne charger en mémoire que les images des sous-volumes. L'occupation mémoire et le temps de calcul sont ainsi réduits de manière drastique (4 Go en moyenne par processus). La contrepartie de cette astuce réside cependant dans le fait que la transformation finale résultant du processus de recalage ne peut être directement appliquée aux volumes dans leur intégralité. Une adaptation de celle-ci, tenant compte du positionnement des sous-volumes dans leur pile respective, est nécessaire pour qu'elle soit applicable aux volumes entiers (c.f. figure 5.20, page 56).

Afin d'identifier le volume commun aux deux piles et sélectionner les images respectives, une interface graphique a été implémentée, permettant de visualiser et de faire défiler côte-à-côte les images des piles *recto* et *verso*. Cette interface permet de sélectionner les bornes inférieures et supérieures<sup>27</sup> des sous-volumes *recto* et *verso*. Les seuls requis pour cette sélection sont un nombre d'images sélectionnées par sous-pile impair et deux images médianes respectives correspondantes. Cette limitation est liée à une autre fonctionnalité de l'interface, utilisée pour l'initialisation du recalage (c.f. 'Initialisation de la transformation', page 52).

25. Les images sont acquises en 12-bit mais sont enregistrées en 16-bit

26. Swapping

27. Les numéros d'images de début et de fin des sous-piles

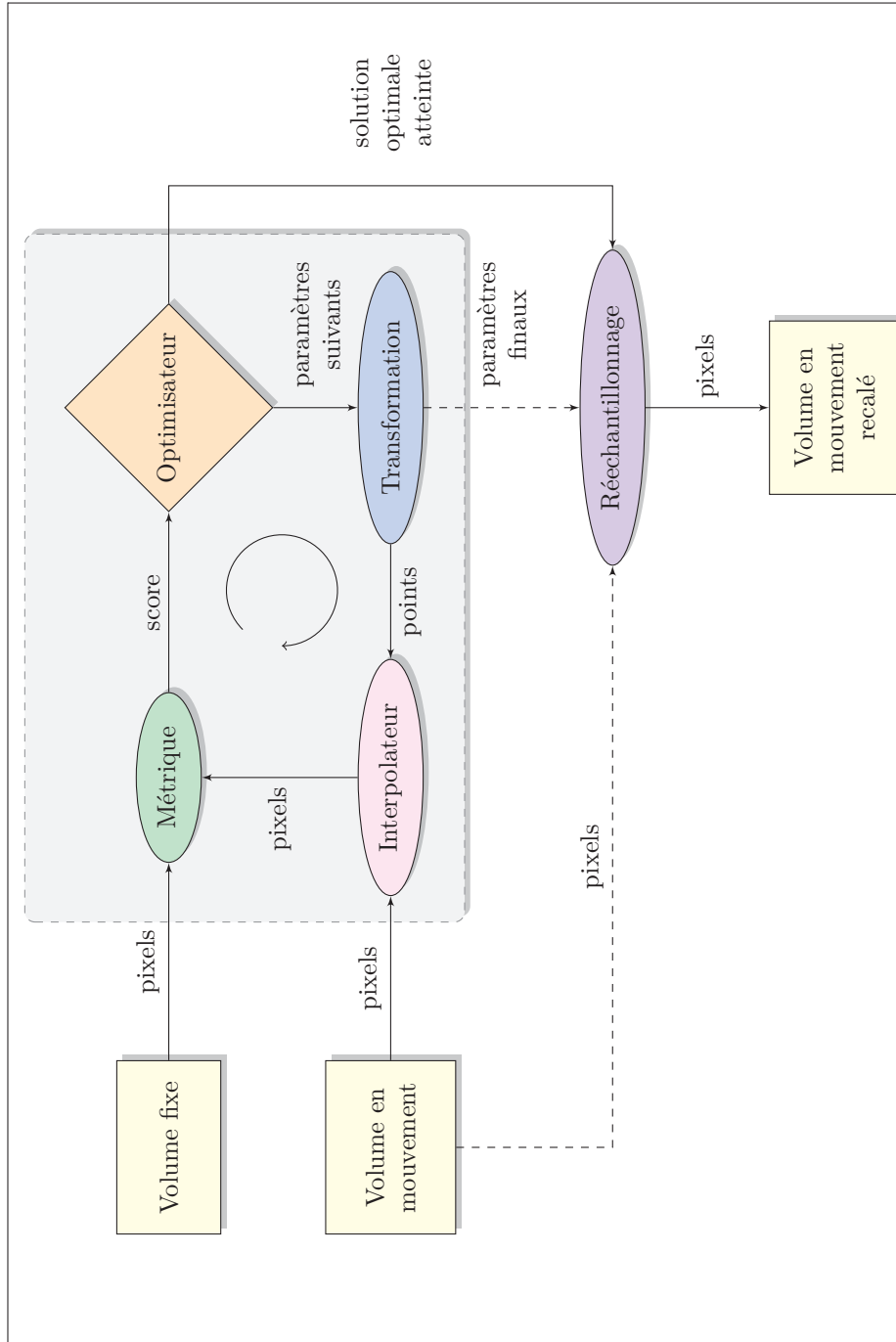


FIGURE 5.15 – **Diagramme de l'implémentation du processus de recalage**

Soit deux volumes à recaler, l'un fixe et l'autre en mouvement. Le recalage consiste à trouver la transformation à appliquer au volume en mouvement pour le positionner par rapport au volume fixe. Les quatre composants formant le cœur du recalage sont la métrique, l'optimisateur, la transformation et l'interpolateur, et sont compris à l'intérieur d'une boucle dont la sortie ou la continuité dépend de la décision que va prendre l'optimisateur à chaque cycle. A chaque itération, on calcule la valeur de la métrique à partir du volume fixe et du volume en mouvement, préalablement déplacé par la transformation actuellement considérée. Cette valeur, mesurant l'exactitude du recalage à ce moment précis, est récupérée par l'optimisateur qui détermine à son tour les six nouvelles valeurs de paramètres de la transformation à appliquer dans la prochaine itération de la boucle. La répétition de la boucle prend fin quand l'optimisateur estime être suffisamment proche de la solution, à savoir la transformation que l'on recherche.

### Détermination de la transformation

Lors de l'acquisition, le montage est retourné horizontalement entre les acquisitions *recto* puis *verso*. En outre, afin d'effectuer un zoom scanner maximal, le champ de vision est également pivoté pour chaque acquisition (c.f. figure 5.10, page 41). Enfin, l'échantillon n'étant pas exactement à la même position lors de chaque acquisition, la position globale de l'objet n'est pas la même sur les images de la pile *recto* et celles de la pile *verso*. On a donc comparativement entre les deux piles un déplacement de l'objet selon les trois axes  $OxOyOz$ .

Le sous-volume de la pile *recto* est donc d'une certaine manière le sous-volume de la pile *verso* (vu que l'on considère les images comme correspondantes), sur lequel on a effectué idéalement les opérations géométriques suivantes :

1. Rotation de  $180^\circ$  autour d'un axe passant par son milieu et parallèle à l'axe  $Oy$
2. Rotation dans le plan des images d'un angle  $\gamma$  qui dépend des rotations des champs de visions à l'acquisition *recto* et *verso*
3. Translation selon les trois axes  $OxOyOz$

On peut donc ainsi représenter l'ensemble de ces rotations et la translation par une seule transformation rigide<sup>28</sup> effectuant une rotation (composition des rotations) et une translation. Le centre de rotation est fixé sur le centre de la sous-pile *recto* et la rotation s'effectue autour de ce centre. La translation quant à elle est représentée par un vecteur reliant les deux centres des sous-volumes (ce qui tend à « ramener » un volume sur l'autre après les rotations), plus une petite différence calculée via la fonctionnalité de recalage manuel de l'interface (c.f. figure 5.17, page 53).

En pratique, la transformation dépend également d'une rotation autour de l'axe  $Ox$  et la rotation autour de l'axe  $Oy$  n'est pas exactement de  $180^\circ$ . Cela est dû notamment au fait que le support et les coverslips ne sont pas parfaitement perpendiculaires au rayon laser. Trouver la transformation qui aligne idéalement les volumes n'est donc pas triviale, notamment parce que l'on doit tenir compte de la non commutativité des rotations dans l'espace<sup>29</sup>. Raison pour laquelle une recherche automatique par recalage est une approche judicieuse.

### Adéquation de la métrique

Lors de l'acquisition, la perte de luminosité découlant de l'augmentation de la profondeur d'acquisition est compensée en ajustant le gain à la hausse, de sorte qu'au final on obtient une luminosité visuellement constante au niveau des images d'une pile (c.f. 'Contraste', page 42).

Cette constance dans la luminosité des images se vérifie au niveau des sous-volumes utilisés pour le recalage. Si l'on ne peut pas garantir une même intensité lumineuse entre le sous-volume *recto* et le sous-volume *verso* — les conditions d'acquisitions restent différentes —, on peut garantir par contre une certaine constance de luminosité à l'intérieur même de chaque sous-volume. Ce point précis détermine le choix de la métrique qui suit.

Le critère de similarité (ou métrique) retenu est ainsi la corrélation normalisée [37, 33, 36, 26, 39, 46]. Cette métrique, comme le critère des moindres carrés moyennés (m.c), est uniquement adaptée aux images à recalage de même modalité. Par contre, au contraire des m.c, elle n'est pas sensible à une différence d'intensité entre images d'acquisitions différentes, pour autant que cette différence soit linéaire [30]. Cette particularité est due à la normalisation qui intervient dans le calcul de ce critère, obtenue par division de

28. Conservation des distances

29. L'ordre dans lequel sont effectuées les rotations a une importance. Des ordres différents donnent des résultats différents

la corrélation entre images par la racine carrée de l'auto-corrélation des images :

$$NC(A, B) = -1 \cdot \frac{\sum_{i=1}^N (A_i \cdot B_i)}{\sqrt{\sum_{i=1}^N A_i^2 \cdot \sum_{i=1}^N B_i^2}} \quad (5.2)$$

$A_i$  est le  $i^{\text{ème}}$  pixel de l'image A,  $B_i$  le  $i^{\text{ème}}$  pixel de l'image B et  $N$  le nombre de pixels considérés.

Cette métrique est optimale quand son minimum est atteint<sup>30</sup>, son optimum se situant à -1. Un mauvais alignement résulte en des valeurs faibles, rapprochées de 0. Cette mesure donne de bons résultats dans notre cas, permettant à l'optimisateur de converger habituellement vers la bonne solution relativement rapidement (c.f. 'Étude du comportement de la métrique', page 62). Elle constitue ainsi le meilleur choix vis-à-vis de métriques plus générales et plus complexes à calculer, telle l'information mutuelle par exemple [43, 42, 45, 31, 32, 44, 35, 38, 40, 41].

### Méthode d'optimisation

Comme abordé dans la partie informatique introductive, effectuer une recherche exhaustive de toutes les valeurs de paramètres possibles afin de trouver la transformation idéale n'est pas envisageable et très peu efficace. En conséquence, on emploie un optimisateur qui utilise la métrique comme information afin de décider dans quelle direction prospecter, à chaque itération.

La méthode d'optimisation employée dans le cadre de ce processus de recalage est celle de la descente de gradient [47, 34, 27, 28, 29]. Elle se nomme ainsi car on utilise le calcul du gradient de la mesure de similarité (plus précisément l'opposé du gradient) pour trouver dans quelle direction descendre.

Concrètement, elle consiste à calculer à chaque itération les prochaines valeurs de paramètres de la transformation pour la prochaine itération, à partir :

- des valeurs de paramètres de la transformation considérés à ce moment-là
- une direction multipliée par un pas d'avancement

Chacune des nouvelles valeurs des paramètres est donc le résultat de son ancienne valeur à laquelle on a ajouté une variation qui lui est propre. Cette variation est dictée par la direction prise par l'optimisateur pour la prochaine itération et par le pas par lequel il décide d'avancer.

$$paramètres_{k+1} = paramètres_k + \delta \cdot d \quad (5.3)$$

$k$  est l'itération actuelle,  $k+1$  la suivante,  $\delta$  le pas d'avancement optimal et  $d$  la direction de descente, calculé à partir de la valeur de métrique pour les anciens paramètres.

Cette méthode de recherche du minimum comporte cependant deux faiblesses :

- elle est sensible aux minimums locaux, i.e. elle tend à rester dans une vallée si elle tombe dedans
- elle a une vitesse de convergence faible quand l'optimisateur est proche de la solution

Dans notre cas d'utilisation, cette méthode donne de bons résultats, car l'initialisation manuelle situe l'optimisateur d'emblée dans la vallée où se trouve la transformation optimale recherchée (c.f. 'Étude du comportement de la métrique', page 62). De plus, comme l'initialisation est déjà particulièrement proche de la solution, le problème de vitesse de convergence ne constitue pas en soit un problème remettant en question son utilisation. La méthode de pyramides d'images multirésolution, discutée dans les perspectives (c.f. 'Perspectives et conclusions', page 77), est une possibilité cependant de pouvoir diminuer cet inconvénient.

---

30. La valeur la plus négative parmi toutes les valeurs possibles en fonction de son calcul sur les images

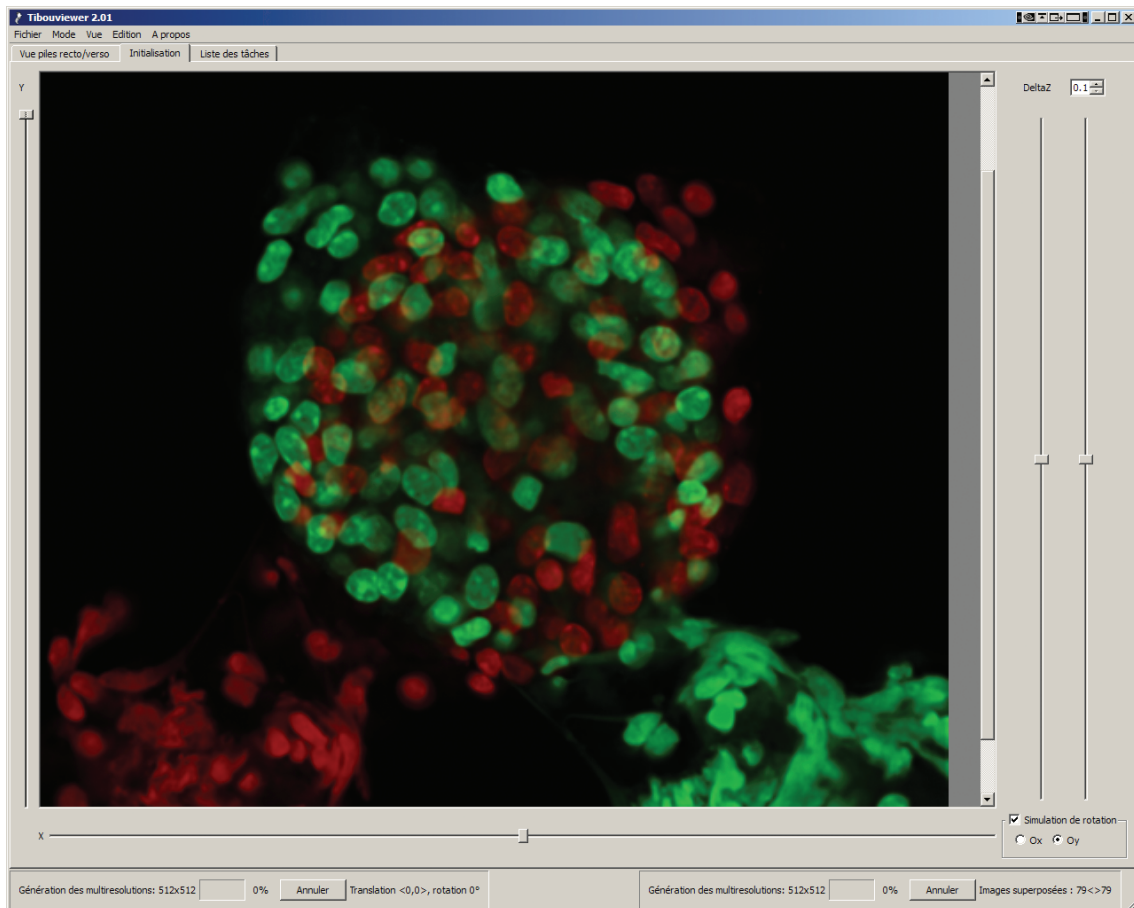


FIGURE 5.16 – **Superposition des images médianes**

Cette partie de l'interface permet la détermination des paramètres de la transformation initiale en superposant les images médianes des sous-volumes *recto* et *verso*. L'angle de rotation dans le plan des images et la translation selon les axes  $Ox$  et  $Oy$  peuvent ainsi être fixés.

### Initialisation de la transformation

Le but du processus de recalage est donc de trouver par une recherche automatique la meilleure transformation qui aligne le sous-volume *verso* sur le sous-volume *recto*. En ce sens, plus on se trouve proche de la solution dès le départ et plus on a de chance de converger vers celle-ci. De plus, les temps de calculs s'en trouvent également raccourcis, du fait d'un nombre d'itérations moindre pour arriver à la solution.

Ainsi initialiser la transformation avec des valeurs de rotation et de translation rapprochées des valeurs finales améliore grandement les chances de succès. Dans ce but, la première opération effectuée est la rotation de  $180^\circ$  autour de l'axe  $Oy$ , simulant le retournement du montage pour l'acquisition côté *verso* (c.f. figure 5.19, page 55).

Il s'agit ensuite de déterminer la compensation des rotations des champs de vision des deux acquisitions. Pour ce faire, une deuxième fonctionnalité a été ajoutée à l'interface graphique : celle-ci permet la superposition visuelle des images médianes des deux sous-piles. On peut ainsi régler la rotation et la translation d'une image par rapport à l'autre, tout en tenant compte de la rotation préalable autour de  $Oy$  du sous-volume *verso* (c.f. figure 5.16, page 52). Cette astuce graphique permet ainsi de choisir l'angle de la deuxième rotation à appliquer au sous-volume *verso*, et par la même occasion de compenser le décalage en translation des deux piles d'images.

La rotation autour de  $Oy$  est simulée dans l'interface en effectuant une symétrie horizontale de l'image

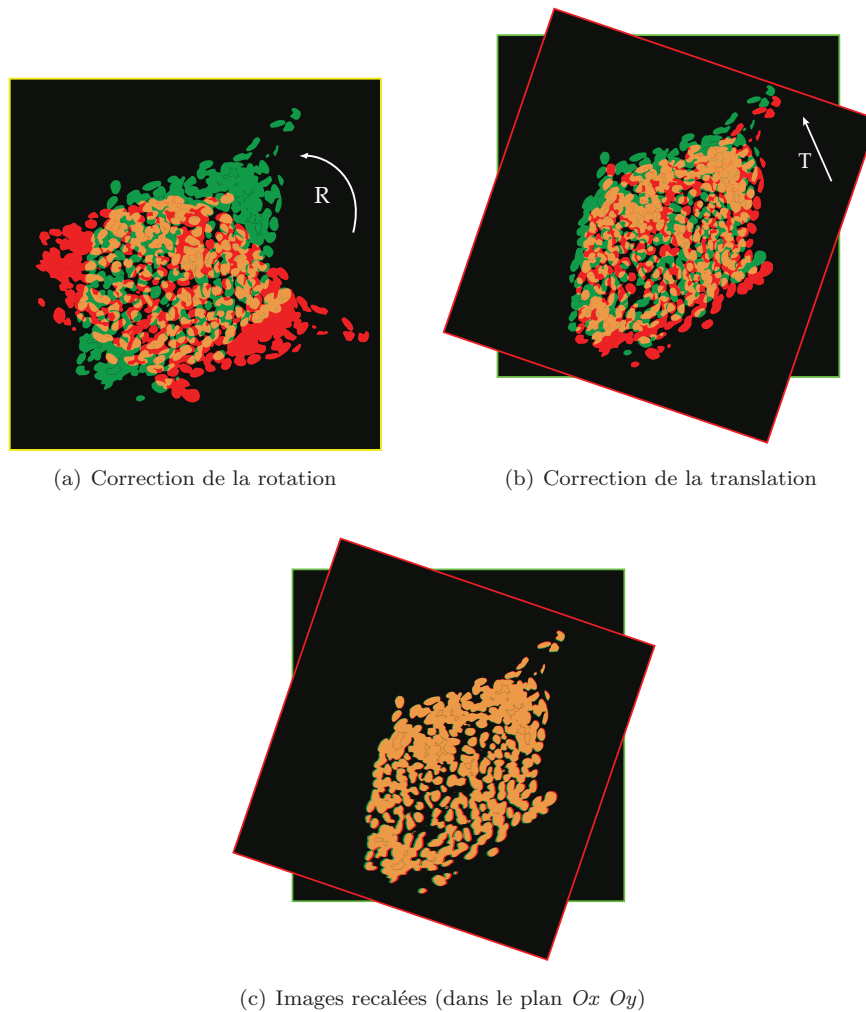


FIGURE 5.17 – Principe du recalage manuel

Le principe de ce recalage manuel initial est de se rapprocher de la solution idéale avant de lancer le processus de recalage automatique. Pour ce faire on compense les rotations de champ de vision des deux acquisitions en effectuant une rotation dans le plan des images médianes. On compense ensuite le décalage des piles en translation  $Ox Oy$ .

*verso*. Cette astuce n'est possible que parce que l'on considère les images médianes des sous-piles. En temps normal, une symétrie dans un volume n'est pas équivalente à une rotation de  $180^\circ$  autour d'un axe parallèle à  $Oy$  passant par le centre. Dans le cas particulier considéré du plan des images médianes, une telle rotation revient à effectuer une symétrie horizontale de l'image (c.f. figure 5.18, page 54).

Les angles des deux rotations successives et la translation ainsi déterminées, ces valeurs sont enregistrées dans un fichier binaire via une autre interface graphique ad-hoc permettant l'édition des paramètres nécessaires au recalage. Parmi ces paramètres initiaux, on retrouve également la taille physique des voxels (le recalage se fait en coordonnées physiques) et les numéros d'images de début et fin des piles d'images, ainsi que des sous-volumes sélectionnés. Sont enfin également spécifiés diverses valeurs de paramètres destinés à l'optimisateur : poids attribués aux différents paramètres, pas d'avancement minimum et maximum, nombre d'itérations maximum.

Le stockage des données dans un fichier permet ainsi de conserver les valeurs pour toutes les piles à recaler. Il permet également de pouvoir récupérer les paramètres comme base pour d'autres piles d'images (notamment pour les paramètres de l'optimisateur) ou encore pour d'autres traitements futurs, comme par exemple des analyses statistiques. Le programme de recalage est ensuite exécuté avec en paramètre

$$\begin{aligned}
& T_1 \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \neq T_2 \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \\
& (R_{Oz}(\gamma) \circ R_{Oy}(\beta)) \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \neq (R_{Oz}(\gamma) \circ \sigma_{Oy}) \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \\
& \begin{pmatrix} \cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ \sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos(\beta) & 0 & \sin(\beta) \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin(\beta) & 0 & \cos(\beta) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \neq \begin{pmatrix} \cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ \sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \\
& \begin{pmatrix} \cos(\beta)\cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & \cos(\gamma)\sin(\beta) \\ \cos(\beta)\sin(\gamma) & \cos(\gamma) & \sin(\beta)\sin(\gamma) \\ -\sin(\beta) & 0 & \cos(\beta) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \neq \begin{pmatrix} -\cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ -\sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix}
\end{aligned}$$

Comme on tourne de  $180^\circ$  autour de  $Oy$  ( $\cos(\pi) = -1$ ,  $\sin(\pi) = 0$ ) :

$$\begin{pmatrix} -\cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ -\sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \neq \begin{pmatrix} -\cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ -\sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (5.4)$$

En 2D, la troisième coordonnée devient nulle :

$$\begin{aligned}
& \begin{pmatrix} -\cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ -\sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\cos(\gamma) & -\sin(\gamma) & 0 \\ -\sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ 0 \end{pmatrix} \\
& \begin{pmatrix} -x\cos(\gamma) - y\sin(\gamma) \\ y\cos(\gamma) - x\sin(\gamma) \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -x\cos(\gamma) - y\sin(\gamma) \\ y\cos(\gamma) - x\sin(\gamma) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5.5)
\end{aligned}$$

FIGURE 5.18 – **Compositions de rotations et symétries en 2D et 3D**

En 3D, si l'on considère une transformation  $T_1$  constituée d'une rotation d'un angle  $\beta$  selon l'axe  $Oy$  suivie d'une rotation d'un angle  $\gamma$  selon  $Oz$ , cette transformation n'est pas équivalente (c.f equation 5.4) à une transformation  $T_2$  représentée par une symétrie selon l'axe  $Oy$  suivie d'une rotation autour de l'axe  $Oz$ . En 2D par contre, avec l'annulation de la coordonnée selon l'axe  $Oz$ , ces transformations sont équivalentes (c.f equation 5.5).



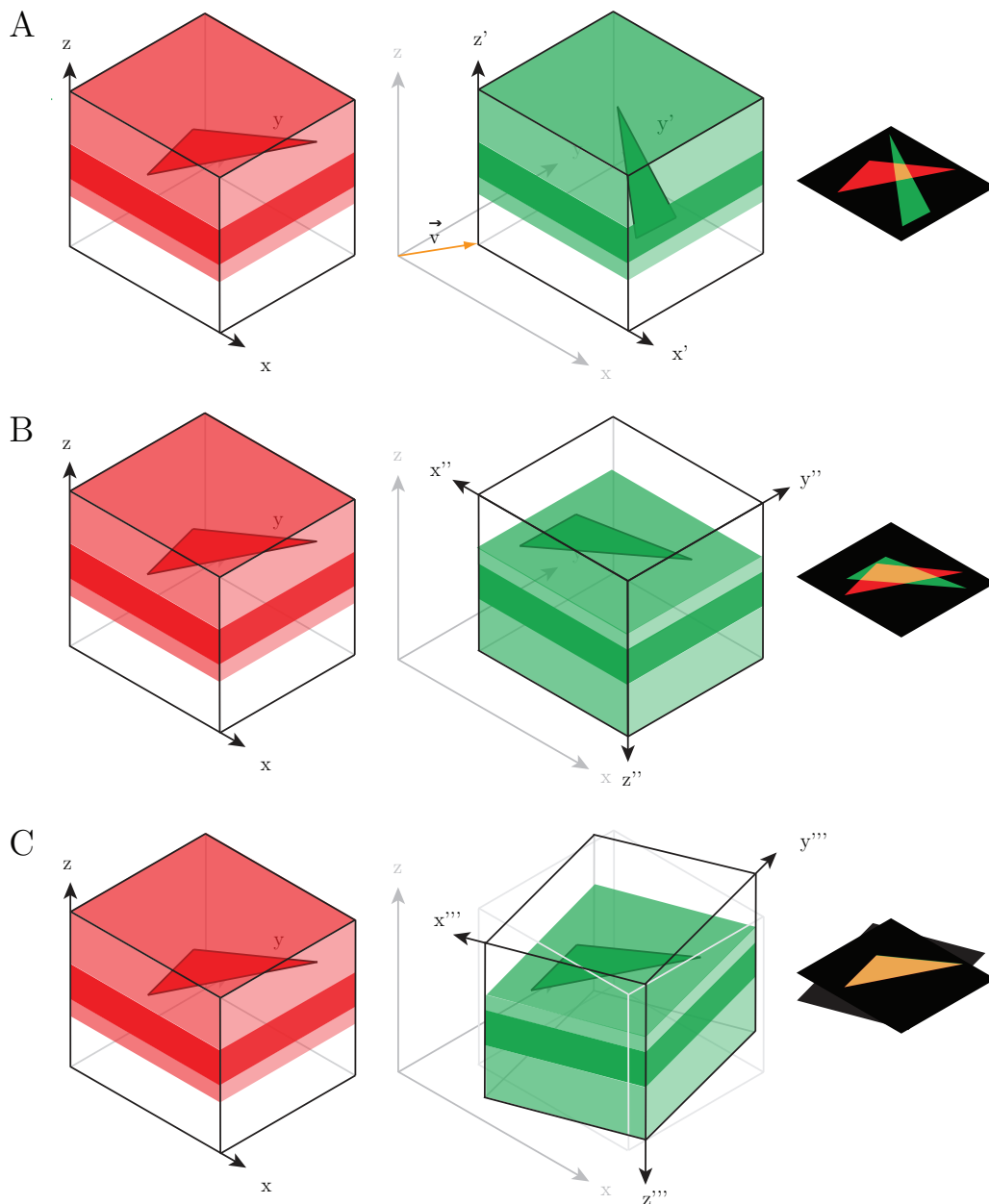


FIGURE 5.19 – Principe de l'initialisation de la transformation

Le principe de l'initialisation de la transformation consiste à reproduire les manipulations effectuées lors des acquisitions *recto* et *verso* afin de se rapprocher de la transformation idéale visant à recaler le volume *verso* sur le volume *recto*. Du fait que l'échantillon ne peut être parfaitement centré par rapport au montage à la manipulation, un déplacement de l'échantillon selon les axes  $Ox$  et  $Oy$  est constaté entre les deux volumes suite au retournement du montage. La translation  $\vec{v}$  compense donc en partie celui-ci (A). Le retournement du montage est simulé par une rotation de  $180^\circ$  (B), et l'effet cumulé des rotations du champ de vision imprimées à chacune des deux acquisitions est reproduit par une unique rotation équivalente dans le plan des images (C).

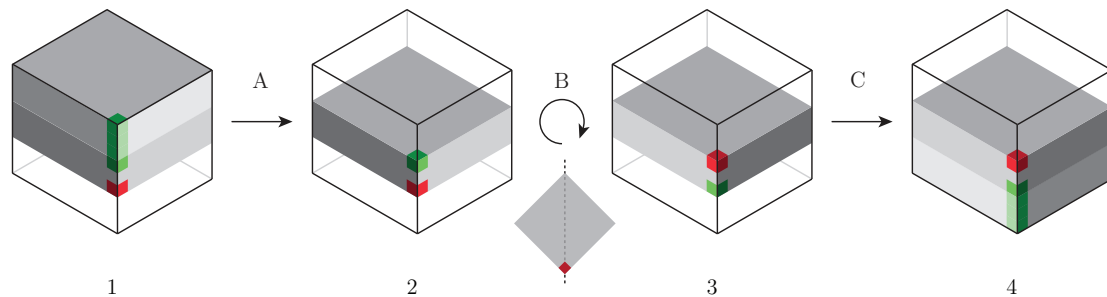


FIGURE 5.20 – **Effet du changement des coordonnées**

Le recalage ayant été effectué sur les sous-volumes *recto* et *verso*, l'application de la transformation finale aux volumes entiers nécessite une adaptation. Cette modification n'est pas effectuée directement sur la transformation, mais sur les piles d'images entières. En recalculant les origines de celles-ci relativement à la position de leurs sous-piles respectives, la transformation s'applique toujours selon les sous-volumes, et les volumes entiers se déplacent ainsi par rapport à ceux-ci.

ce fichier de données initiales de recalage. Le calcul du recalage prend en moyenne 1h de temps et produit un fichier des données finales. Ce fichier comporte, en plus des données initiales, les valeurs de paramètres de la transformation finale. Sont également produits en sortie le sous-volume *recto* et le sous-volume *verso* par la transformation initiale et finale, permettant ainsi de pouvoir vérifier si l'initialisation et l'alignement final sont exacts<sup>31</sup>.

### Modification de la transformation finale

La transformation finale ainsi déterminée, une opération d'adaptation est nécessaire. En effet, le processus de recalage s'étant effectué sur les sous-volumes, la transformation ne peut être directement appliquée sur les volumes entiers. En effet, la transformation finale est calculée par rapport aux coordonnées d'origine des sous-piles et non de celles des piles entières. En recalculant et en fixant les coordonnées d'origines des piles entières par rapport à leurs sous-volumes, il est ainsi possible d'utiliser la transformation directement. Intuitivement, le fait de changer les coordonnées d'origine d'une pile entière par rapport à sa sous-pile revient en quelque sorte à « scotcher » le reste de la pile au sous-volume. Ainsi, quand le sous-volume est tourné et déplacé par la transformation, le volume entier le contenant le « suit » (c.f. figure 5.20, page 56).

Cette modification des coordonnées se fait dans un nouveau programme qui permet d'appliquer la transformation finale au volume *verso* entier. Ce programme produit deux piles de taille égale, l'une les images *recto* et l'autre avec les images résultant de l'application de la transformation au volume *verso*.

### Sélection des images

Comme le recalage s'est effectué sur un volume commun, on a donc une information maintenant redondante entre les deux volumes. Il s'agit dès lors de sélectionner dans chacune des piles, au niveau du volume commun, les images que l'on souhaite garder de l'une ou l'autre. On sélectionne ainsi les meilleures images de chacune, de telle manière à avoir un volume final constitué d'une partie des images de la pile *recto* et d'une partie des images de la pile *verso* après application de la transformation finale. La sélection des images se fait via l'interface graphique (c.f. figure 4.1, page 22).

31. Le logiciel *Bitplane Imaris<sup>TM</sup>* est utilisé, il permet d'observer les volumes recalés image par image ou en 3D

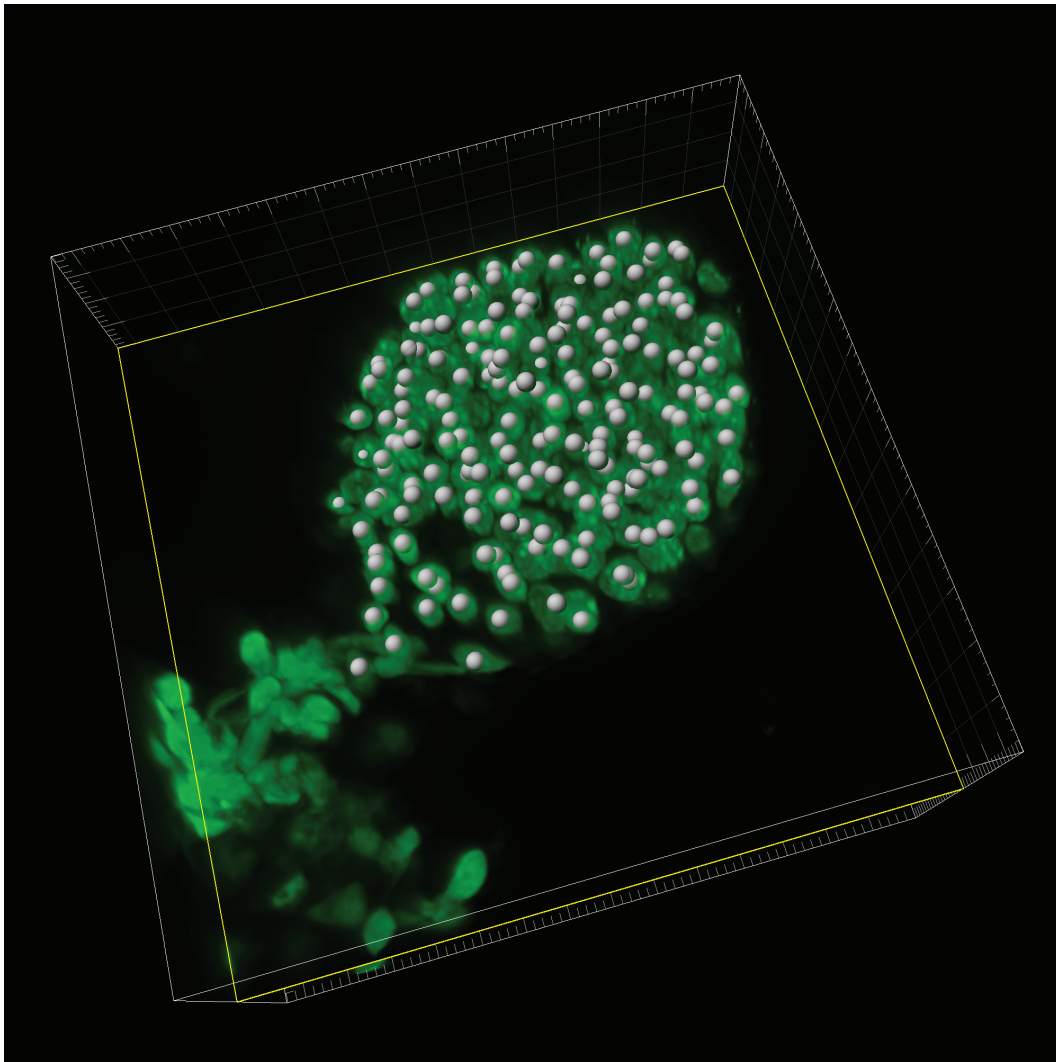


FIGURE 5.21 – **Détection de noyaux**

L'utilisation d'un plan de coupe orthogonal (« orthoslicer ») permet de pouvoir vérifier si la détection nucléaire est correcte pour les paramètres entrés. De cette manière, il est possible de pouvoir détecter les erreurs de comptage et effectuer des corrections, en ajoutant ou supprimant des sphères.

### 5.2.3 Reconnaissance et comptage des noyaux

#### Reconnaissance et comptage des noyaux

*Bitplane Imaris<sup>TM</sup>* propose parmi ses outils une méthode de détection d'objets selon une technique de « spot detection » : pour chaque volume identifié, une sphère est visuellement attribuée. On spécifie dans l'algorithme le diamètre minimal des objets à détecter et les objets ainsi identifiés peuvent ensuite être filtrés de diverses manières, permettant ainsi de raffiner l'ensemble des objets finaux identifiés. Ces filtrages successifs influencent donc directement le nombre final d'objets comptés, à savoir dans notre cas les noyaux.

Le premier critère de détection consiste en la définition du diamètre minimal d'objet dont il s'agit de tenir compte. Cette première valeur est critique car elle détermine la taille approximée des objets qui sont détectés, et mal fixée, elle peut mener

- à des noyaux comptés à double, si le diamètre spécifié est trop petit
- à des noyaux non comptés du fait d'un diamètre considéré trop grand

Il s'agit donc logiquement de déterminer le diamètre qui minimise l'erreur tantôt dans un sens tantôt

dans l'autre. En définitive, seule une détermination empirique permet de parvenir au diamètre minimal apparemment optimal pour l'ensemble des volumes à analyser. Cela est d'autant plus vrai que les noyaux de la papille folliculaire sont plutôt oblongs, contrairement aux noyaux épithéliaux qui eux sont sphériques. Le risque d'avoir ainsi plusieurs sphères (volumes identifiés) pour un noyau est donc plus grand pour cette catégorie de noyaux. Il faut donc apporter une attention particulière à ce paramètre.

Afin de parvenir à une solution satisfaisante au niveau de l'exactitude de la reconnaissance nucléaire, l'utilisation de plans de coupe orthogonaux sous *Bitplane Imaris<sup>TM</sup>* se révèle fort utile. En faisant varier la position des plans de coupe dans le volume de la papille folliculaire, il est ainsi possible de vérifier visuellement si la détection des noyaux tend plutôt dans le sens d'une surévaluation ou d'une sous-évaluation.

Selon les concepteurs du logiciel, il est nécessaire de régler les valeurs de paramètres selon le type de données à analyser. Cela conduit donc à devoir déterminer empiriquement les valeurs des paramètres adaptées aux échantillons, ce qui rend ainsi la procédure moins aisée que de prime abord. En effet, afin de dégager une tendance, il est nécessaire d'analyser un certain nombre de piles d'images et de valeurs de paramètres différents. De plus, les temps de calculs et la quantité de données en mémoire ralentissent la fréquence des tests possibles. Enfin, une vérification des détections via les plans de coupe reste nécessaire après chaque test, afin de juger objectivement de la pertinence du résultat.

En définitive, pour avoir testé des diamètres variant de  $2.5 \mu m$  à  $7 \mu m$ , la tendance a une évaluation correcte a été déterminée à  $4 \mu m$ , pour un seuillage de filtrage automatique.

### Correction des erreurs de reconnaissance

Parmi les sources d'erreurs de reconnaissance, outre le problème de sur ou sous-détection de noyaux, les tissus épithéliaux restants de la microdissection occupent une place importante dans les erreurs de comptage.

Il n'existe pas de méthode à proprement parler dans *Bitplane Imaris<sup>TM</sup>* pour arriver à soustraire automatiquement les parties épithéliales qui seraient restées à la microdissection. Ces parties de tissus restent souvent étroitement attachés à la papille folliculaire par la lame basale et il est donc difficile de les individualiser par un traitement automatique<sup>32</sup>. La durée des calculs et les résultats hasardeux qui en résultent sont suffisamment dissuasifs pour finir rapidement par chercher une autre solution.

Heureusement, il est possible de pouvoir influencer sur le décompte des sphères en agissant directement dessus. En effet, il est possible d'en ajouter ou d'en supprimer par simple clic à la position souhaitée dans le volume. Il est par conséquent possible de pouvoir corriger les erreurs de comptage en supprimant les sphères attribuées aux cellules épithéliales. De même, il est possible de supprimer les éventuelles sphères surnuméraires pour des cellules de la papille folliculaire, ou d'ajouter le cas échéant des sphères aux noyaux non détectés. En utilisant les plans de coupe orthogonaux et en comparant avec les images brutes des piles, il est possible d'identifier avec très peu d'erreur les noyaux épithéliaux (c.f. figure 5.21, page 57). La correction par contre des noyaux « oubliés » nécessiterait cependant pour plus d'exactitude le développement d'un petit module additionnel dont il sera question dans les perspectives.

---

32. Utilisation d'isosurfaces comme masque par exemple

# 6

## Résultats

Cette dernière partie traite des résultats découlant de la validation de la méthode développée et de son application à des données biologiques expérimentales. L'étape de validation est primordiale afin de garantir par la suite la validité des comptages obtenus avec cette méthode dans un cadre expérimental.

### 6.1 Validation de la méthode

La méthode développée se veut une alternative pertinente lorsque l'épaisseur ou la densité d'un échantillon interdit son acquisition intégrale par les moyens habituels de microscopie confocale. Une manière de valider l'exactitude de cette méthode de recalage est de démontrer que le nombre de noyaux dénombrés est similaire que ce soit sur un échantillon de petite taille entièrement acquis ou sur ce même échantillon acquis *recto-verso* puis recalé.

Comme précisé dans la partie introduction biologique (c.f. 'Modèle expérimental : les follicules de vibrisse de souris', page 1), la taille des follicules de vibrisse varie selon la position de ceux-ci sur le museau de l'animal. De plus, la taille de la papille folliculaire reste proportionnelle à la taille du follicule. Ainsi, plus la vibrisse est petite, plus la papille folliculaire l'est également.

Par conséquent, des papilles folliculaires de petites tailles ont été extraites de plusieurs vibrisses de la colonne  $e$  (prélèvement à  $P_8$ ). Parmi celles-ci, il a finalement été possible de réussir une acquisition complète sur l'une d'entre elles.

La méthode de validation suivante a ainsi été mise au point :

- On effectue une acquisition complète de l'échantillon côté *recto*, puis de manière identique côté *verso*. On dénombre ensuite les noyaux pour chacun des deux volumes obtenus
- Partant de l'acquisition entière face *recto* de la papille folliculaire, on crée une pile *recto* incomplète en enlevant des images à la fin de cette dernière (c.f. figure 6.1, page 60). On simule ainsi une acquisition jusqu'à une profondeur supérieure à la moitié de l'échantillon. La même simulation de pile *verso* incomplète réalisée, on procède à :
  - un recalage manuel via l'interface graphique (recalage d'initialisation)
  - un recalage automatique, en utilisant le recalage manuel comme point de départ

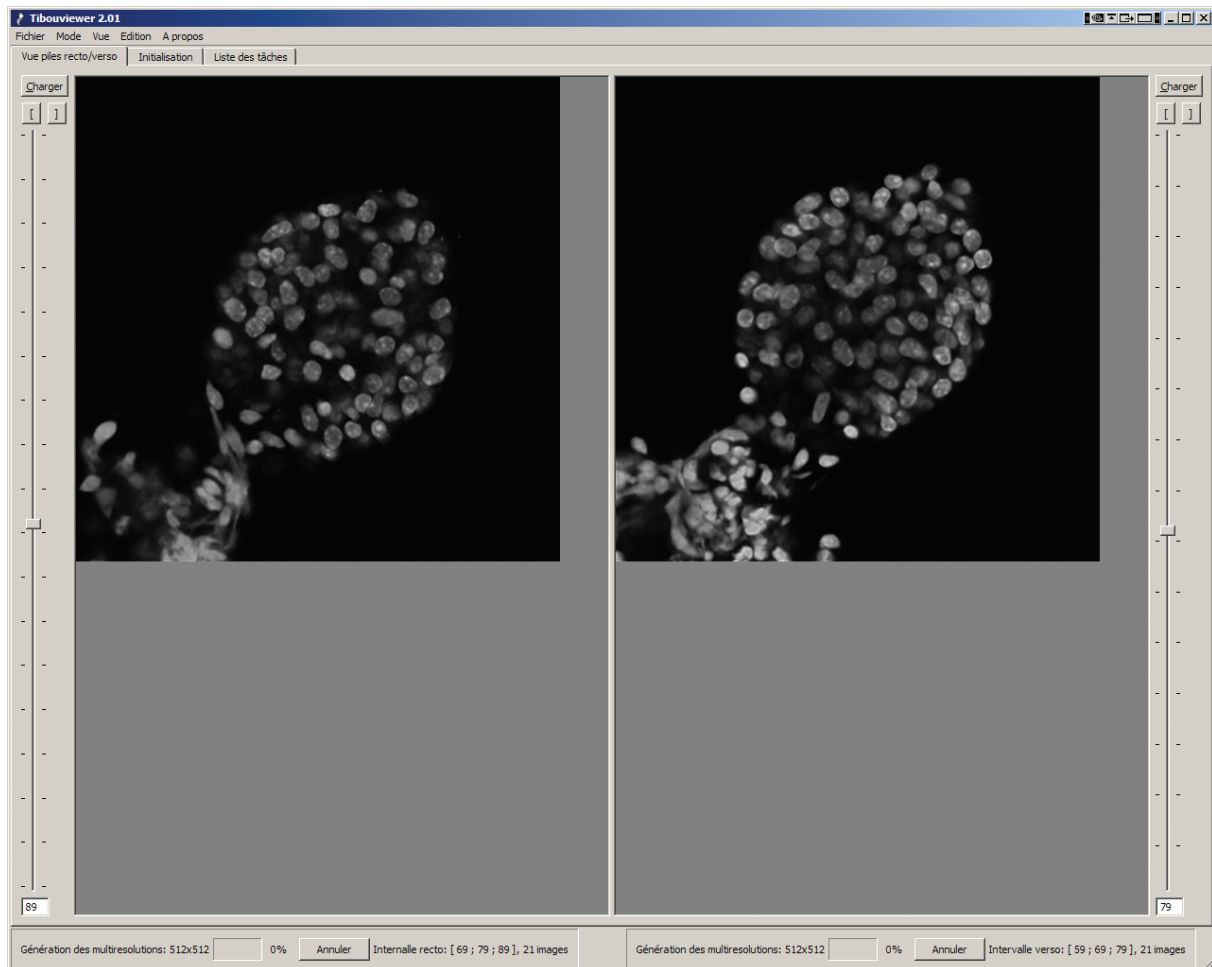


FIGURE 6.1 – Sélection des images des sous-piles pour le recalage

Les images sélectionnées pour les sous-volumes sont  $n^{os} 69 - 89$  pour le sous-volume *recto* et  $n^{os} 59 - 79$  pour le sous-volume *verso*. Le décalage des numéros d'images est notamment dû au fait que la papille est un peu plus écrasée du côté du coverslip sur lequel elle repose (le *verso*, côté support).

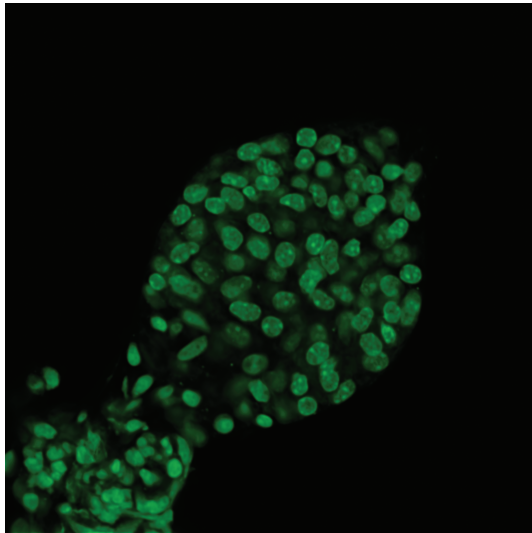
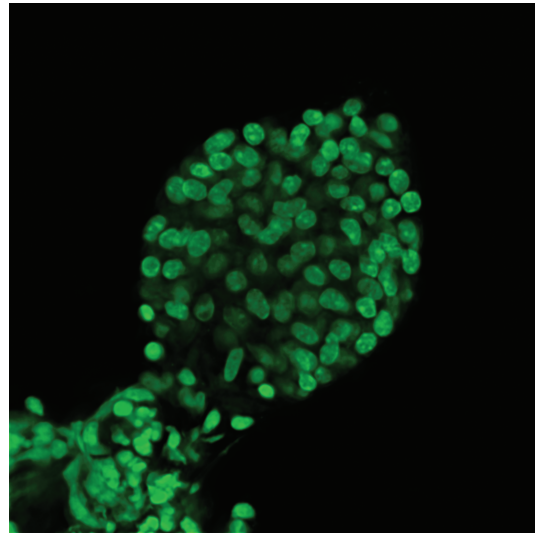
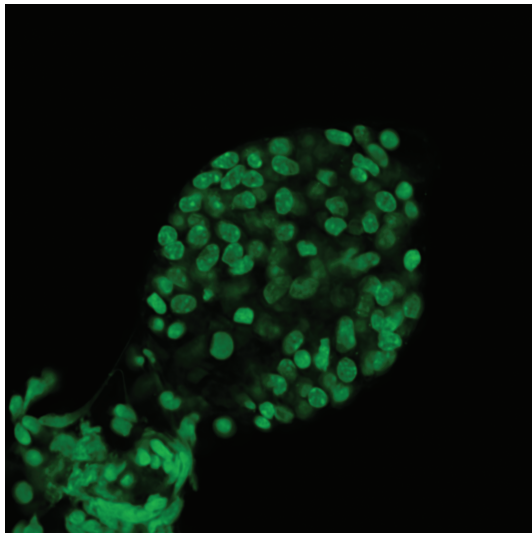
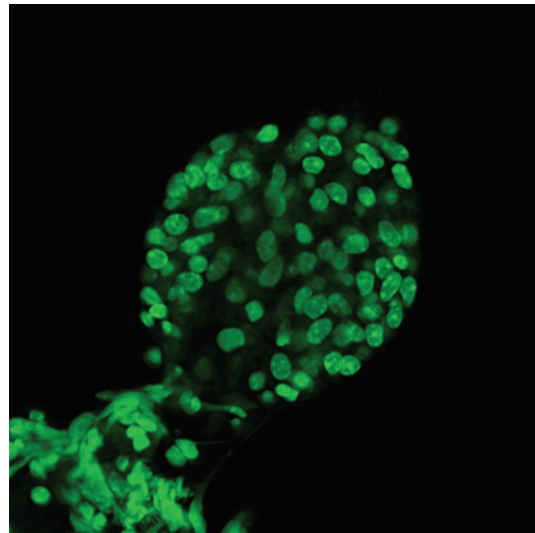
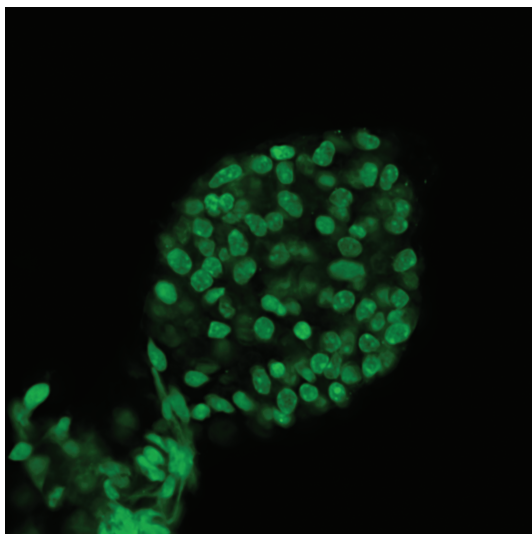
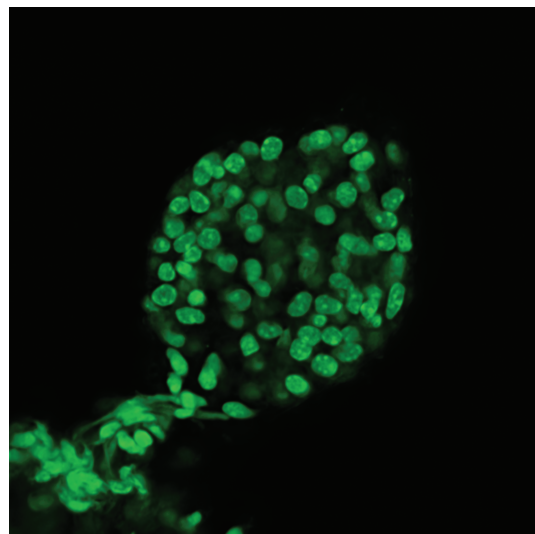
- Un comptage est ensuite effectué sur une pile fusionnée obtenue avec le recalage manuel uniquement, puis sur une autre pile fusionnée obtenue par la procédure de recalage automatique.

La comparaison de noyaux dénombrés directement sur l'ensemble de la papille folliculaire ou après recalage des deux volumes *recto* et *verso* donne ainsi une appréciation de l'exactitude de la méthode utilisée.

### 6.1.1 Acquisition et déconvolution

La papille folliculaire de validation a été acquise intégralement face *recto*, puis le montage a été retourné pour permettre l'acquisition face *verso*, également de manière intégrale. Les piles obtenues ont ensuite été déconvoluées avec *SVI Huygens<sup>TM</sup>*. Les paramètres utilisés sont ceux établis dans les protocoles décrits précédemment, à la différence que seul l'objectif 20x glycérol a été utilisé<sup>1</sup> (c.f. 'Montage', page 20). Du fait de la petitesse de l'échantillon, la qualité d'image obtenue s'est révélée excellente jusqu'à la profondeur maximale, minimisant ainsi l'erreur de comptage sur le volume entier par la suite. A noter une légère différence d'intensité entre les images des deux sous-piles, celles de l'acquisition *verso* étant

1. L'utilisation du 63x n'a pas été rendue possible, la distance de travail de celui-ci n'est pas suffisante pour une acquisition intégrale

(a) Profondeur dans la pile *recto* : 44  $\mu m$ (b) Profondeur dans la pile *verso* : 51  $\mu m$ (c) Profondeur dans la pile *recto* : 48  $\mu m$ (d) Profondeur dans la pile *verso* : 48  $\mu m$ (e) Profondeur dans la pile *recto* : 57  $\mu m$ (f) Profondeur dans la pile *verso* : 38  $\mu m$ **FIGURE 6.2 – Images des sous-volumes *recto* et *verso***

Les images de début, milieu et fin des sous-piles *recto* (colonne de gauche) et *verso* (colonne de droite) sont représentées ici. Les images médianes correspondantes sont (c) et (d). A noter que l'ordre des images est inversé pour la sous-pile *verso* (début (f), fin (b)). Les profondeurs respectives sont indiquées pour une origine au début de la pile entière contenant les images.

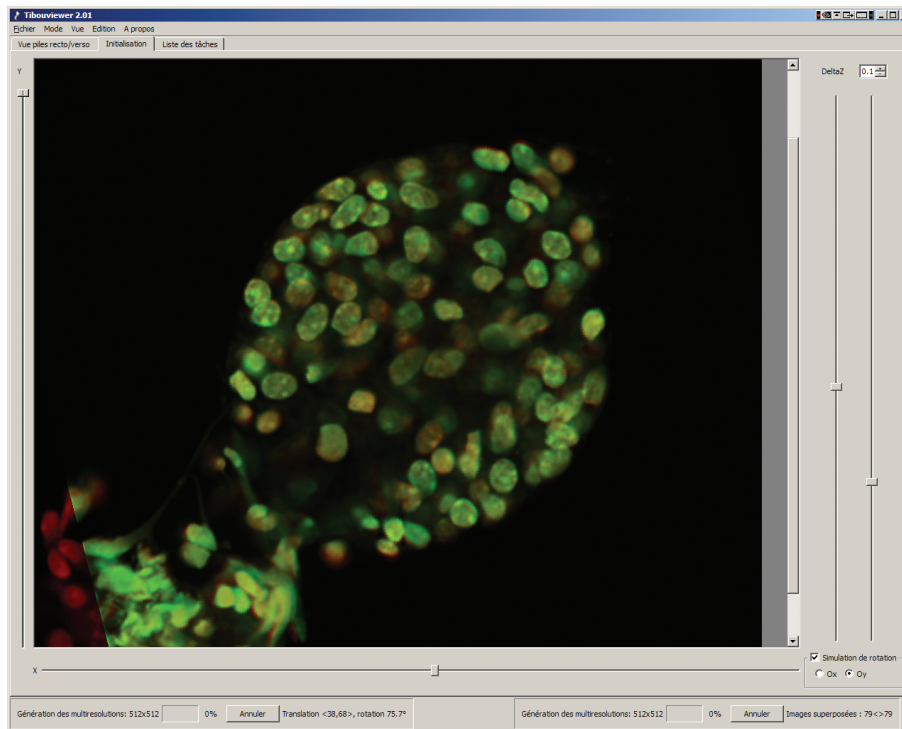


FIGURE 6.3 – **Recalage manuel pour l’initialisation du recalage**

L’interface graphique permet de déterminer aisément l’angle de compensation des rotations de champ de vision lors des acquisitions *recto* et *verso*, ainsi que la translation résultant de la position non centrale de l’échantillon par rapport au montage (c.f. figure 5.19, page 55).

plus claires (c.f. figure 6.2, page 61).

Les dimensions relevées pour l’échantillon sont d’environ  $78 \mu\text{m}$  pour l’épaisseur, et de  $90 \mu\text{m}$  de diamètre au milieu de la papille folliculaire.

### 6.1.2 Recalage

#### Recalage manuel, automatique et reconstitution des volumes entiers

Comme mentionné précédemment, il s’agit d’appliquer le processus de recalage sur les piles de validation incomplètes afin de reconstituer le volume entier de la papille. La sélection des images constituant les sous-volumes *recto* et *verso* à recaler et le recalage manuel d’initialisation sont effectués via l’interface graphique (c.f. figure 6.3, page 62) selon le protocole habituel (c.f. ‘Sélection des images des sous-volumes’, page 22). Le recalage automatique est ensuite exécuté, produisant comme résultat la transformation finale à appliquer au volume *verso*.

On reconstitue ensuite deux volumes complets de la papille de validation, à savoir :

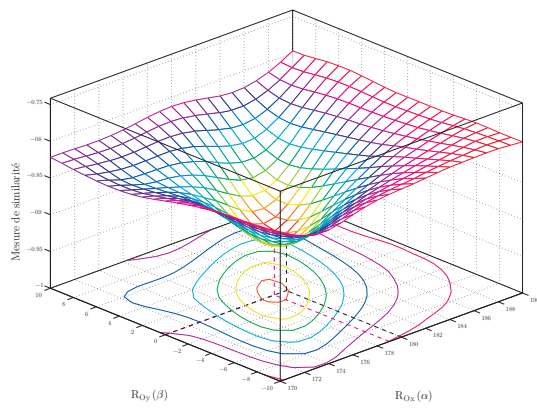
- un volume obtenu avec le recalage manuel
- un volume obtenu avec le recalage automatique

Les deux volumes ainsi reconstitués sont ensuite analysés sous *Bitplane Imaris<sup>TM</sup>* afin de déterminer le nombre de noyaux qu’ils contiennent (c.f. table 6.1, page 69).

#### Étude du comportement de la métrique

Afin de comprendre comment régler les paramètres liés à l’optimisateur, il est nécessaire de connaître les caractéristiques de la métrique, particulièrement aux environs de la transformation initiale. En effet, comme la méthode d’optimisation utilise la métrique pour résoudre le problème de recalage, la meilleure





(a) Graphe 3D

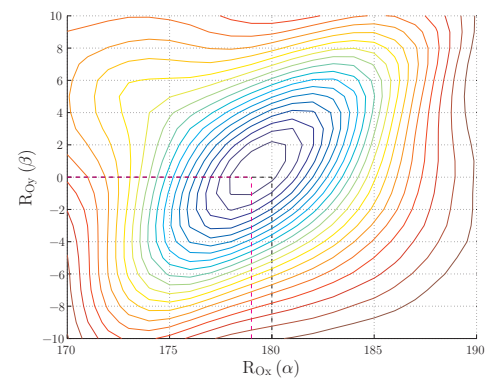
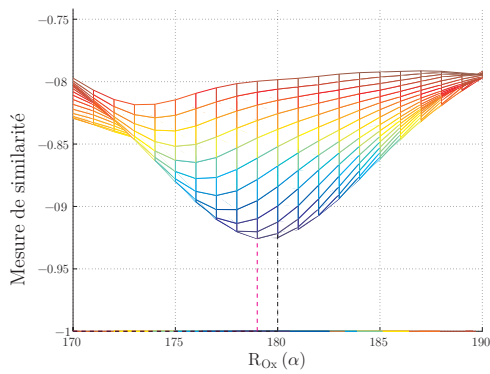
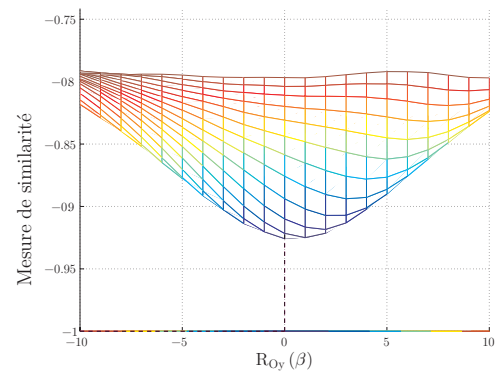
(b) Projection  $R_{Ox}R_{Oy}$ (c) Projection  $R_{Ox}$ (d) Projection  $R_{Oy}$ 

FIGURE 6.4 – Étude du comportement de la métrique pour  $R_{Ox} \circ R_{Oy}$   
 Rotations autour de l'axe  $Ox$ , puis autour de l'axe  $Oy$  de  $\pm 10^\circ$ , par pas de  $1^\circ$ .

approche pour régler l'optimisateur consiste à étudier le comportement de la métrique. Pour ce faire, le programme de recalage a été modifié de sorte que l'on puisse soit exécuter un recalage, soit effectuer une analyse de la métrique sur un certain domaine de recherche.

La méthode à appliquer pour étudier le critère de similarité consiste à faire varier deux paramètres de la transformation selon certains intervalles respectifs, tout en fixant les autres restants. Dans notre cas, notre transformation comporte six paramètres, c'est-à-dire trois pour la rotation (les trois angles de rotations axiales) et trois pour la translation. Cela revient donc à faire varier deux paramètres et à en fixer quatre, pour un cas d'étude.

Ainsi, pour chaque variation des valeurs de deux paramètres de la transformation, on calcule la valeur de la métrique résultant de la superposition du sous-volume *verso* sur le sous-volume *recto*, par la transformation (qui varie).

Les graphiques associés à ces cas d'étude sont présentés dans les pages suivantes (c.f. figures 6.4-6.6, page 63-66). Les paramètres de variations ont été fixés comme suit :

- pour les paramètres de translation  $T_{Ox}$  et  $T_{Oy}$ , le pas de variation est de  $0.05 \mu m$ . Il correspond à une valeur en-dessous de la taille du pixel selon les dimensions  $x$  et  $y$  des images ( $0.087 \mu m$ )
- pour le paramètre de translation  $T_{Oz}$ , le pas de variation est de  $0.5 \mu m$ . Il correspond à une valeur en-dessous de l'espacement entre les images constituant les volumes ( $0.65 \mu m$ )
- pour les paramètres de rotation  $R_{Ox}$ ,  $R_{Oy}$  et  $R_{Oz}$ , le pas de variation des angles de rotation a été fixé soit à  $1^\circ$  soit à  $0.1^\circ$

D'après les graphiques obtenus pour le recalage de validation, on peut constater que la métrique comporte un seul minimum (ligne discontinue magenta), à proximité de la transformation initiale (ligne discontinue noire). Idéalement, la transformation recalant parfaitement les deux sous-volumes devrait également être représentée sur le graphique. Cela permettrait ainsi de pouvoir observer si la solution optimale se trouve dans une autre vallée que celle où se trouve la transformation initiale, auquel cas la méthode de gradient ne pourrait converger vers celle-ci (c.f. 'Méthode d'optimisation', page 51).

En pratique, il n'a pas été possible de déterminer « à l'oeil » les valeurs des paramètres de la transformation idéale. Cela est notamment dû au fait que l'ordre effectué des rotations dans l'espace a son importance : une rotation  $R_{Ox}(\alpha)$  suivie d'une rotation  $R_{Oy}(\beta)$  ne donne pas le même résultat qu'une rotation  $R_{Oy}(\beta)$ , suivie d'une rotation  $R_{Ox}(\alpha)$ , même pour des angles  $\alpha$  et  $\beta$  respectifs identiques dans les deux cas. Il est donc mal aisé de pouvoir déterminer, en appliquant manuellement une transformation, quelles valeurs de paramètre appliquer pour obtenir un recalage idéal.

Cependant, il est à noter que le minimum indiqué sur les graphiques correspond à une transformation qui est très proche de la solution trouvée par le recalage. La transformation n'est pas exactement la même du fait des pas de variation des paramètres respectifs utilisés pour tracer les graphiques. Il est cependant possible de considérer que la solution trouvée par le processus de recalage soit effectivement le minimum global de la métrique pour notre problème, et donc la meilleure solution. Cela est d'autant plus vrai que les intervalles de variations des paramètres pour les graphiques ont été choisis de manière à contenir les valeurs de paramètres probables pour la transformation idéale. En effet, il est par exemple impossible qu'une rotation selon  $Ox$  supérieure à  $10^\circ$  par rapport à la rotation initiale  $Ox$  soit solution pour la transformation optimale (constatation faite sous *Bitplane Imaris*<sup>TM</sup> en visualisation l'effet d'une rotation  $R_{Ox}$  supérieure à  $10^\circ$ ).

### Convergence de l'optimisateur

La convergence de l'optimisateur est donc assurée en effectuant l'initialisation selon la méthode décrite. En effet, comme elle se trouve déjà dans la « bonne vallée » à l'initialisation, la méthode de minimisation ne peut que converger vers le point le plus bas de la vallée dans laquelle elle se trouve. La vitesse par

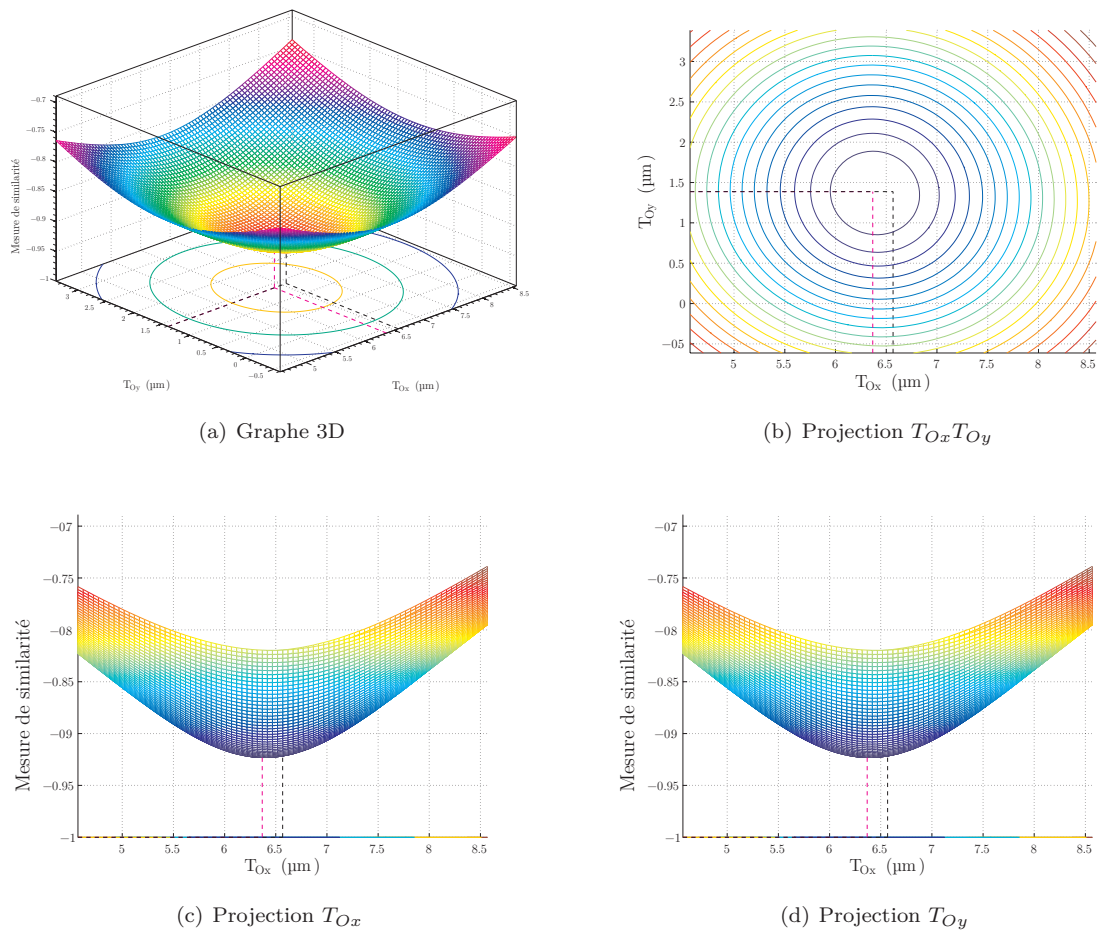
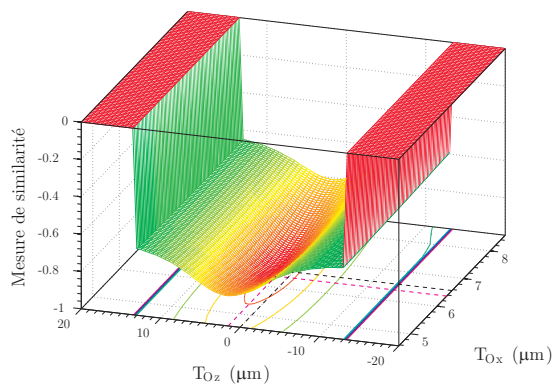
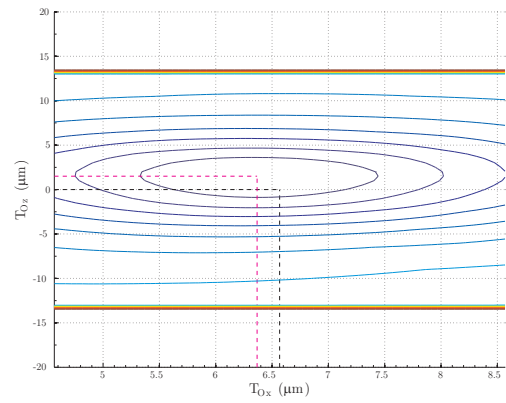
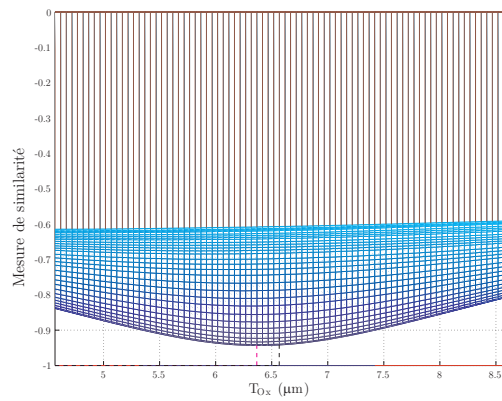
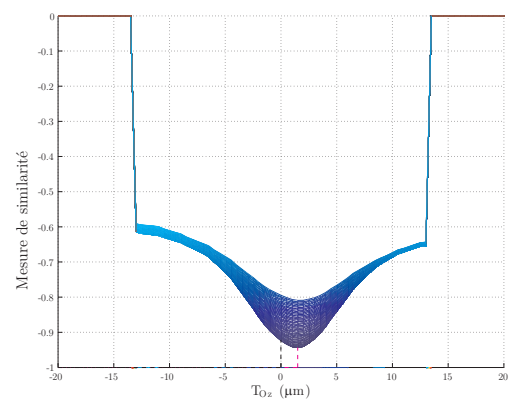


FIGURE 6.5 – Étude du comportement de la métrique pour  $T_{Ox} + T_{Oy}$

Translations selon l'axe  $O_x$  et l'axe  $O_y$ , par pas de  $0.05 \mu m$ . Ce pas d'avancement  $\delta_{xy}$  est inférieur à la taille physique des pixels des images.



(a) Graphe 3D

(b) Projection  $T_{O_x}T_{O_z}$ (c) Projection  $T_{O_x}$ (d) Projection  $T_{O_z}$ FIGURE 6.6 – Étude du comportement de la métrique pour  $T_{O_x} + T_{O_z}$ 

Translations selon l'axe  $O_x$  et l'axe  $O_z$ , par pas respectivement de  $0.05 \mu\text{m}$  et  $0.5 \mu\text{m}$ . Le pas d'avancement  $\delta_z$  est inférieur à la distance physique entre les coupes optiques.

contre avec laquelle elle se rapproche de la solution optimale dépend des valeurs des paramètres de l'optimisateur. Ceux-ci ont été fixés aux valeurs suivantes :

- Pas minimum d'avancement : 0.005
- Pas maximum d'avancement : 0.08
- Nombre d'itérations maximal : 50
- Poids attribué aux rotations : 1
- Poids attribué aux translations selon  $Ox$  et  $Oy$  : 1 000
- Poids attribué à la translation selon  $Oz$  : 1 000 000

Le pas minimum est le critère d'arrêt, ou plus précisément le seuil de sensibilité du critère d'arrêt. Le pas maximum est celui par lequel l'optimisateur avance le plus. Le nombre maximal d'itérations est fixé à 50, mais la convergence s'effectue habituellement en environ 30 itérations (c.f. figure 6.7, page 68). Le poids est mis de préférence sur la translation selon  $Oz$ . La différence importante dans les valeurs de coefficient entre rotations et translations a pour origine qu'un changement d'une unité pour un angle a un impact bien plus grand sur un volume d'images qu'un changement d'une unité en translation. Par conséquent, il est nécessaire d'attribuer moins d'importance aux rotations, afin d'essayer de « normaliser » l'espace des paramètres.

### De l'intérêt d'un recalage automatique

Le recalage automatique donne ainsi de bons résultats, convergeant vers la transformation optimale, correspondant au minimum global de la métrique. Un élément important cependant est à prendre en considération : du fait de l'excellence de l'approximation de la transformation optimale que constitue l'initialisation manuelle, la différence entre la transformation de l'initialisation et la transformation finale trouvée par l'optimisateur est faible. Dans l'optique du décompte final, on observe en définitive quasiment pas de différence de comptage entre les deux piles *recto-verso* recalées par la transformation initiale, issue du recalage manuel, et par la transformation finale, issue du processus de recherche (c.f. table 6.1, page 69). Comme l'erreur se produit qu'à la transition entre les deux piles, cette différence est encore plus atténuée.

Cependant, si l'on s'intéresse à d'autres informations comme les dimensions volumiques des noyaux, la position de certaines cellules dans le volume de la papille (endothéliales par exemple), l'orientation éventuelle de leur noyaux, le processus de recalage garde tout son intérêt. En effet, vu que l'alignement exact est nécessaire, l'erreur commise en faisant un recalage uniquement manuel nécessite de faire une recherche automatique de la meilleure transformation.

Pour ce faire, certaines investigations restent encore à faire, particulièrement pour déterminer le nombre d'images minimum qu'il est nécessaire de sélectionner pour le sous-volume *recto* et pour le sous-volume *verso*, afin d'obtenir un recalage plus fin encore. Actuellement le nombre d'images sélectionnées de 21 ne donne véritablement de bons résultats que si les deux piles d'images sont déjà quasiment alignées en rotation. Cela se produit lorsque que le plan du montage se retrouve idéalement orthogonalement à la ligne du laser, pour les deux acquisitions. Plus l'angle s'écarte de  $90^\circ$ , plus il est possible qu'il s'avère nécessaire d'utiliser un nombre supérieur d'images<sup>2</sup>.

Une solution d'optimisation consisterait à n'augmenter dans un premier temps que le nombre d'images de la sous-pile *recto*, permettant ainsi de toujours avoir le sous-volume *verso* compris entièrement dans le sous-volume *recto*, permettant ainsi de récupérer un maximum d'informations utiles<sup>3</sup> pour son positionnement, lors du calcul de la métrique. Enfin, afin de réduire la quantité de mémoire utilisée et la charge calculatoire, une approche multirésolutions serait à introduire. Cette possibilité a déjà été implémentée par le passé et pourrait donc être à nouveau utilisée.

2. Cela constitue une hypothèse, nécessitant d'être vérifiée

3. Pour rappel, les volumes qui ne s'intersectent pas ne contribuent pas au calcul du score du critère de similarité

Iter	Score	Valeurs des paramètres (rotations, translations)	Pas
0	-0.916662	[0.613521, -0.789521, 3.11339e-006, 6.56888, 1.74747, 0.0735208]	0.08
1	-0.913559	[0.613524, -0.789521, 7.72038e-006, 6.56881, 1.74736, 0.15352]	0.08
2	-0.915027	[0.613527, -0.789521, 1.26036e-005, 6.56874, 1.74724, 0.23352]	0.08
3	-0.916589	[0.61353, -0.789521, 1.79167e-005, 6.56866, 1.74711, 0.313519]	0.08
4	-0.918055	[0.613533, -0.789521, 2.37431e-005, 6.56858, 1.74696, 0.393519]	0.08
5	-0.919404	[0.613536, -0.789522, 3.0254e-005, 6.56848, 1.74679, 0.473518]	0.08
6	-0.920702	[0.61354, -0.789523, 3.74974e-005, 6.56838, 1.74661, 0.553517]	0.08
7	-0.921956	[0.613544, -0.789524, 4.59301e-005, 6.56826, 1.7464, 0.633515]	0.08
8	-0.923107	[0.613548, -0.789526, 5.57086e-005, 6.56812, 1.74616, 0.713513]	0.08
9	-0.924216	[0.613553, -0.789528, 6.72438e-005, 6.56796, 1.74587, 0.793509]	0.08
10	-0.925331	[0.613559, -0.789531, 8.16086e-005, 6.56775, 1.74551, 0.873504]	0.08
11	-0.926433	[0.613566, -0.789535, 0.000101316, 6.56747, 1.74501, 0.953493]	0.08
12	-0.927364	[0.613576, -0.789542, 0.000131641, 6.56703, 1.74422, 1.03347]	0.08
13	-0.928777	[0.613595, -0.789557, 0.000196154, 6.56611, 1.74257, 1.11333]	0.08
14	-0.93068	[0.613634, -0.789568, 0.000651187, 6.55969, 1.73089, 1.09342]	0.04
15	-0.93283	[0.613639, -0.789571, 0.000671033, 6.55941, 1.73037, 1.11333]	0.02
16	-0.933325	[0.613646, -0.789575, 0.000705903, 6.55892, 1.72946, 1.13297]	0.02
17	-0.934012	[0.61365, -0.789576, 0.000727516, 6.55862, 1.7289, 1.15274]	0.02
18	-0.934249	[0.613652, -0.789576, 0.000740913, 6.55844, 1.72855, 1.17249]	0.02
19	-0.934374	[0.613633, -0.78955, 0.00074804, 6.55834, 1.72836, 1.18393]	0.02
20	-0.932322	[0.613636, -0.789552, 0.000759709, 6.55818, 1.72805, 1.17398]	0.01
21	-0.932501	[0.613641, -0.789555, 0.000776041, 6.55795, 1.72763, 1.16409]	0.01
22	-0.932856	[0.613648, -0.789559, 0.000805555, 6.55753, 1.72685, 1.15446]	0.01
23	-0.933369	[0.613665, -0.789565, 0.000903377, 6.55615, 1.7243, 1.15305]	0.01
24	-0.934289	[0.613666, -0.789565, 0.000909216, 6.55607, 1.72414, 1.16276]	0.01
25	-0.934501	[0.613665, -0.789563, 0.000913403, 6.55601, 1.72403, 1.17143]	0.01
26	-0.934575	[0.613668, -0.789563, 0.000924055, 6.55587, 1.72375, 1.18121]	0.01
27	-0.934572	[0.613669, -0.789563, 0.00093209, 6.55576, 1.72354, 1.19084]	0.01
28	-0.934522	[0.613665, -0.789557, 0.000936449, 6.5557, 1.72342, 1.19701]	0.01
29	-0.934311	[0.613669, -0.789558, 0.000953714, 6.55546, 1.72297, 1.1926]	0.005

Paramètres finaux: [0.613669, -0.789558, 0.000953714, 6.55546, 1.72297, 1.1926]

Angles d'Euler (deg): 179.905 -0.300702 -104.289

Translation XYZ (um): 6.55546 1.72297 1.1926

Itérations: 31

Score de la métrique: -0.934671

Pas min: 0.005

Pas max: 0.08

Itérations max: 100

Temps d'exécution: 0 heure(s) 52 minute(s) 13 seconde(s)

### FIGURE 6.7 – Valeurs calculées au cours du processus de recalage

Ce listing montre les valeurs calculées pendant le recalage de la sous-pile *verso* sur la sous-pile *recto* pour les piles de validation *recto* et *verso* non complètes, simulant une acquisition *recto-verso*. On peut noter l'adaptation du pas au cours du recalage, celui-ci diminuant au fur et à mesure que l'optimisateur approche de la solution. On notera également la progression du score de la métrique, qui tend à se rapprocher de la valeur maximum possible pour la *Corrélation Normalisée*, à savoir -1.

### 6.1.3 Comptage nucléaire

Le comptage effectué au niveau de la papille de validation (c.f. figure 6.8, page 70) confirme deux points :

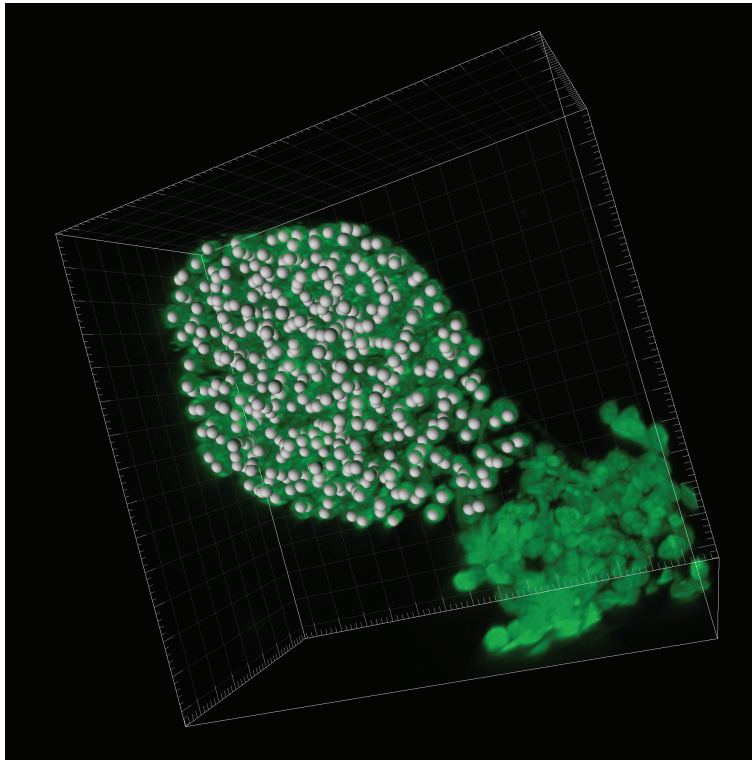
- le comptage résultant d’une acquisition *recto-verso* est équivalent à un comptage à partir d’une acquisition intégrale
- la différence de comptage liée au type de recalage, soit manuel uniquement, soit automatique, n’est pas significative

Type de pile	Nombre noyaux
Pile <i>recto</i> intégrale	485
Pile <i>verso</i> intégrale	496
Pile reconstituée, recalage manuel	480
Pile reconstituée, recalage automatique	487

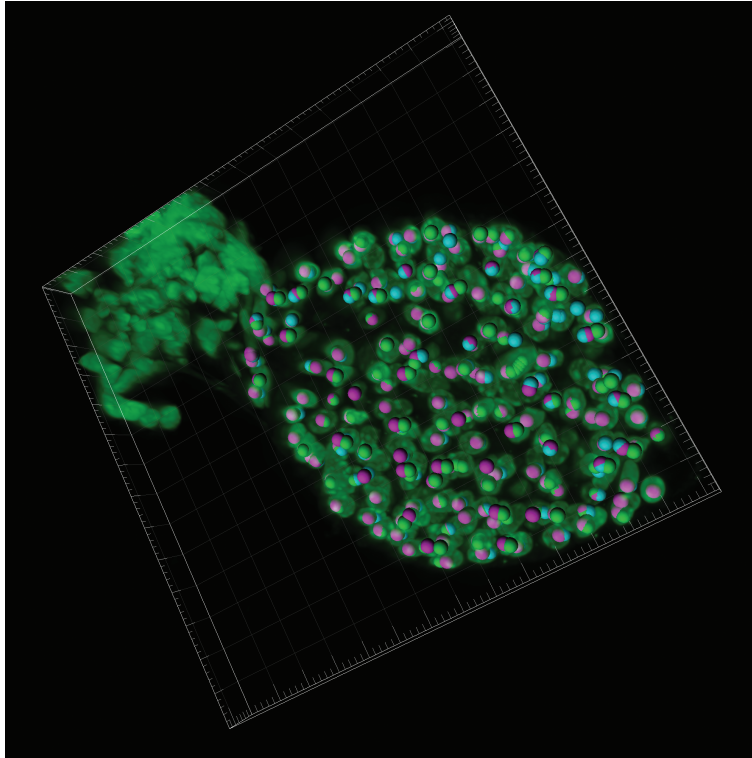
TABLE 6.1 – **Décompte pour la validation du comptage**

Les décomptes obtenus semblent clairement opter pour une équivalence de la méthode.

D’après les résultats de validation ainsi obtenus, le recalage automatique ne constitue pas une nécessité pour le décompte de noyaux au niveau de la papille folliculaire, car l’erreur commise avec un recalage manuel n’est pas significative. Le nombre de noyaux dénombrés grâce à une acquisition entière et dans le cas de notre méthode d’acquisition *recto-verso* sont quasiment identiques et l’erreur minimale. Cependant, pour considérer ces résultats comme exactement équivalents, il est planifié d’effectuer une validation sur quelques papilles supplémentaires afin d’être scientifiquement parfaitement correct.



(a) Volume entier



(b) Volume commun

FIGURE 6.8 – **Détection des noyaux sur volumes entier et commun**

Le résultat du comptage est visuellement présenté ici pour le volume reconstitué par recalage automatique (à gauche) et pour la portion de volume commun sur lequel s'effectue le recalage (à droite). En sphères vertes, les détections pour la pile *recto* complète, en sphères cyan et en sphères magenta pour le recalage automatique. La perspective peut amener à croire que certains noyaux ne sont pas détectés dans les trois modes, ce qui n'est pas le cas en réalité, du fait que certaines sont masquées par des agglomérats de sphères.



## 6.2 Application à la question biologique

La méthode présentée précédemment a été appliquée ici à 7 échantillons expérimentaux : 4 papilles folliculaires *Fgf5*  $+/+$  à  $P_{26}$  et 3 papilles folliculaires *Fgf5*  $-/-$  à  $P_{40}$ . Ces deux points temporels ont été choisis car ils représentent pour chaque type de souris (*Fgf5*  $+/+$  et *Fgf5*  $-/-$ ) le moment où la phase catagène est enclenchée.

### 6.2.1 Comptage final

Génotype	Point temporel	Échantillon	Comptage	
			brut	corrigé
Sauvage	$P_{26}$	<i>Set<sub>2</sub>S<sub>2</sub>a<sub>3</sub>d</i>	2546	1962
		<i>Set<sub>2</sub>S<sub>1</sub>a<sub>3</sub>g</i>	1729	1610
		<i>Set<sub>2</sub>S<sub>1</sub>a<sub>4</sub>d</i>	1739	1585
		<i>Set<sub>2</sub>S<sub>2</sub>a<sub>4</sub>g</i>	1291	1291
Homozygote	$P_{40}$	<i>Set<sub>1</sub>S<sub>2</sub>a<sub>3</sub>g</i>	2796	2477
		<i>Set<sub>1</sub>S<sub>1</sub>a<sub>3</sub>g</i>	2603	1934
		<i>Set<sub>1</sub>S<sub>1</sub>a<sub>4</sub>d</i>	3906	2952

TABLE 6.2 – Décompte pour l'application biologique

Le comptage brut des noyaux est le résultat obtenu sous *Bitplane Imaris*<sup>TM</sup> lorsque le comptage est fait de façon automatique par le programme. Le comptage corrigé est obtenu également sous le même logiciel mais en corrigeant manuellement les erreurs du programme (par exemple : les cellules épithéliales restant après la microdissection qui ne doivent pas être comptabilisées).

Le résultat du comptage final des 7 échantillons est illustré dans la table 6.2.

Au premier abord, lorsque l'on regarde les comptages, il semblerait qu'il y ait une tendance à l'augmentation du nombre de noyaux dans les papilles folliculaires *Fgf5*  $-/-$  comparé aux sauvages. Cependant, lorsque l'on effectue un test t de Student sur ces données, le résultat de ce test statistique entre le nombre de noyaux des papilles *Fgf5*  $+/+$  versus *Fgf5*  $-/-$  n'est pas significatif (c.f. figure 6.9, page 72). Ceci implique que le nombre de noyaux entre les papilles folliculaires *Fgf5*  $+/+$  et *Fgf5*  $-/-$  est identique lors de l'entrée en phase catagène. Étant donné la tendance observée précédemment et le nombre de  $n$  assez petit, d'autres analyses sont en cours afin de déterminer si cette tendance est significative ou pas. Ces résultats ne nous permettent donc pas encore de répondre à la question biologique de départ, mais celle-ci devrait trouver réponse très prochainement grâce aux échantillons actuellement analysés.

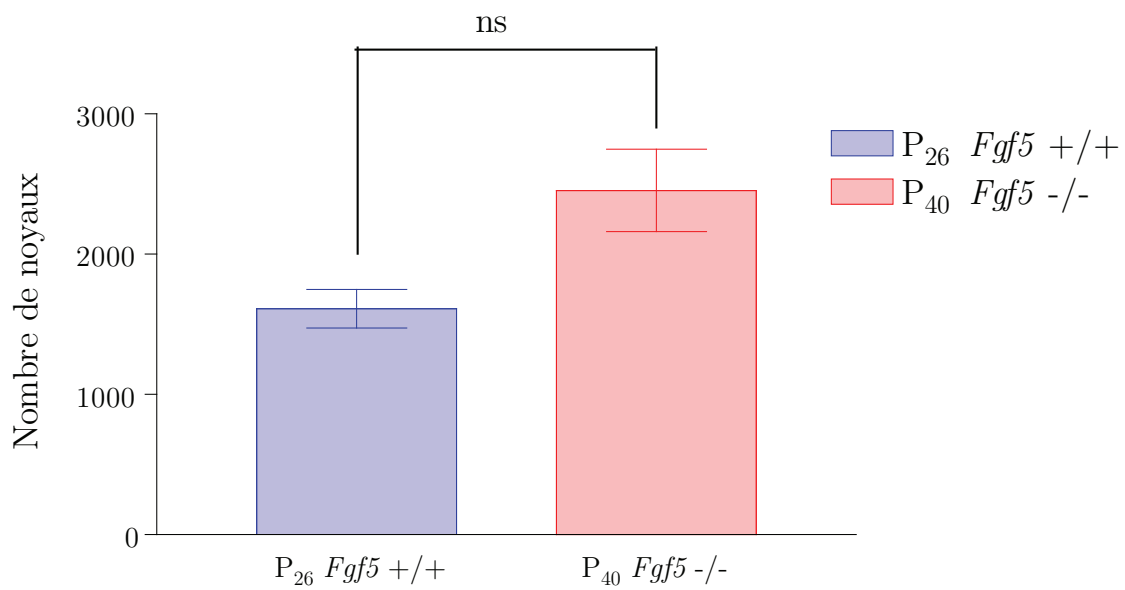
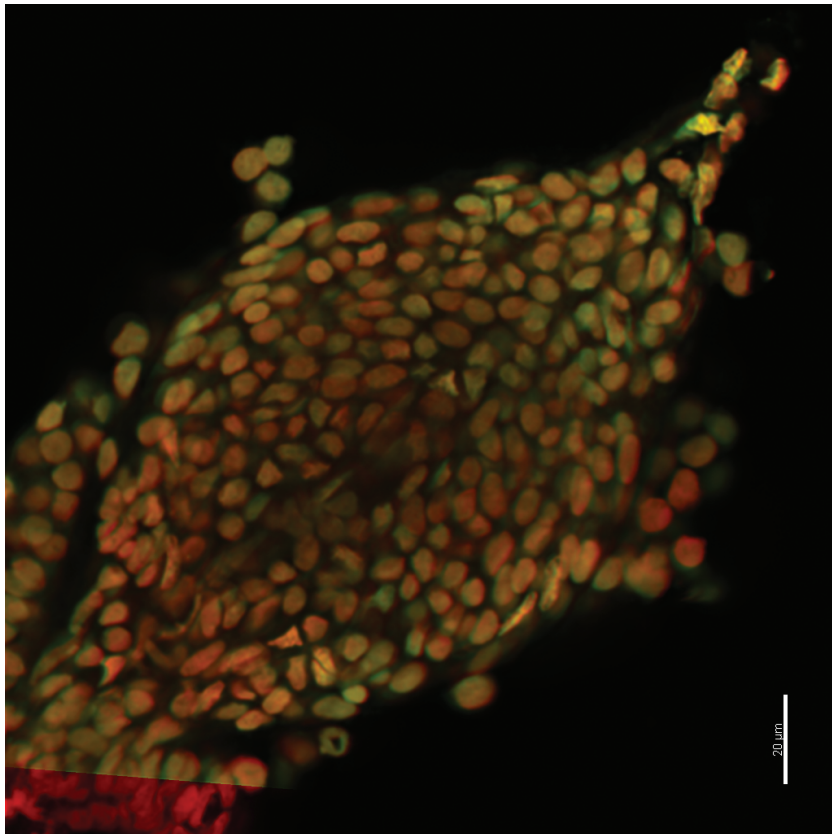
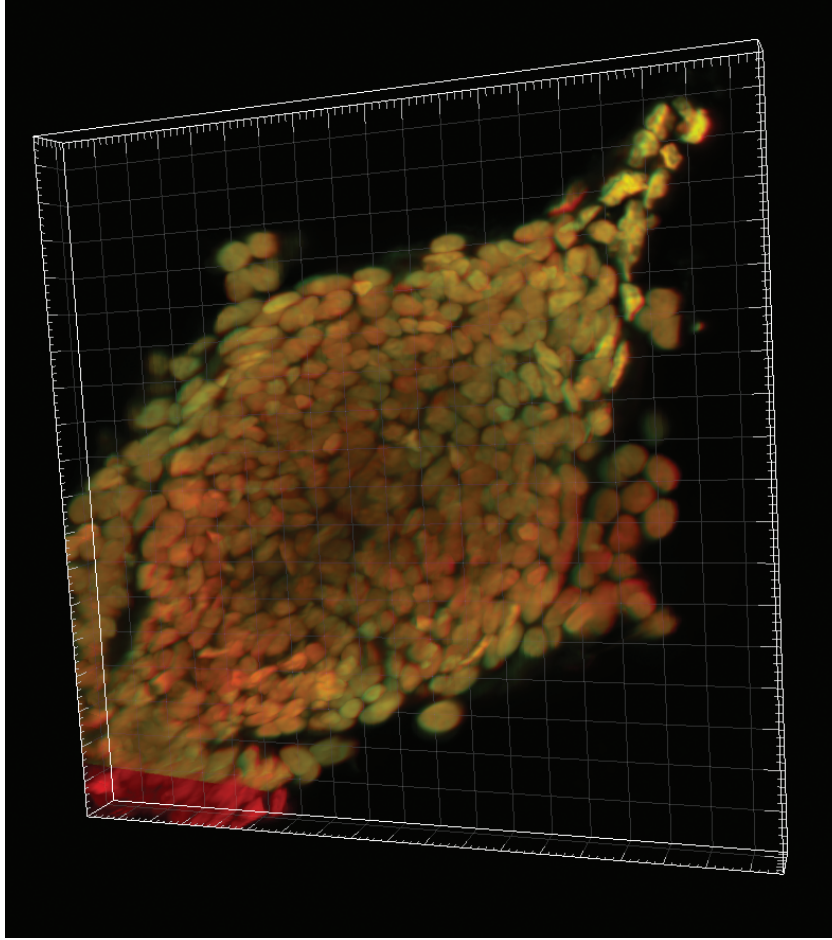


FIGURE 6.9 – Histogramme comparé du nombre de noyaux des papilles folliculaires *Fgf5*  $+/+$  vs *Fgf5*  $-/-$  à l'entrée en phase catagène

Les résultats numériques des comptages semblent indiquer au premier abord une différence dans le nombre de noyaux. Cependant le test statistique effectué ne permet pas à l'heure actuelle de déterminer si cette différence est significative. Une analyse d'un nombre plus important d'échantillon est ainsi nécessaire afin de répondre à la question biologique.



(a) Vue en coupe



(b) Vue 3D

FIGURE 6.10 – **Recalage des volumes *recto* et *verso* d'une papille folliculaire  $P_{26} + / +$**   
 Superposition des images médianes à gauche et vue en 3D des sous-volumes *recto* et *verso* recalés.

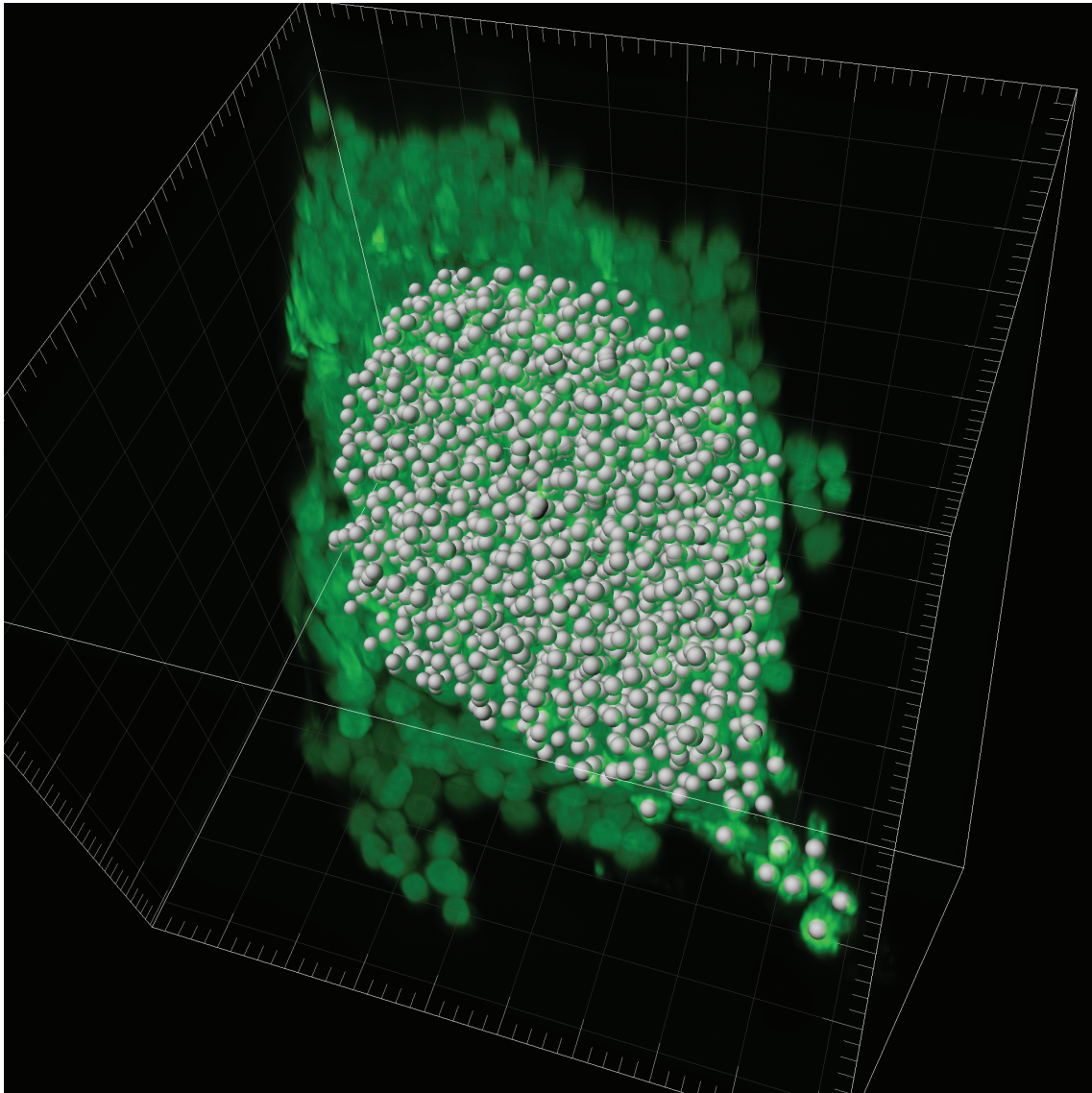
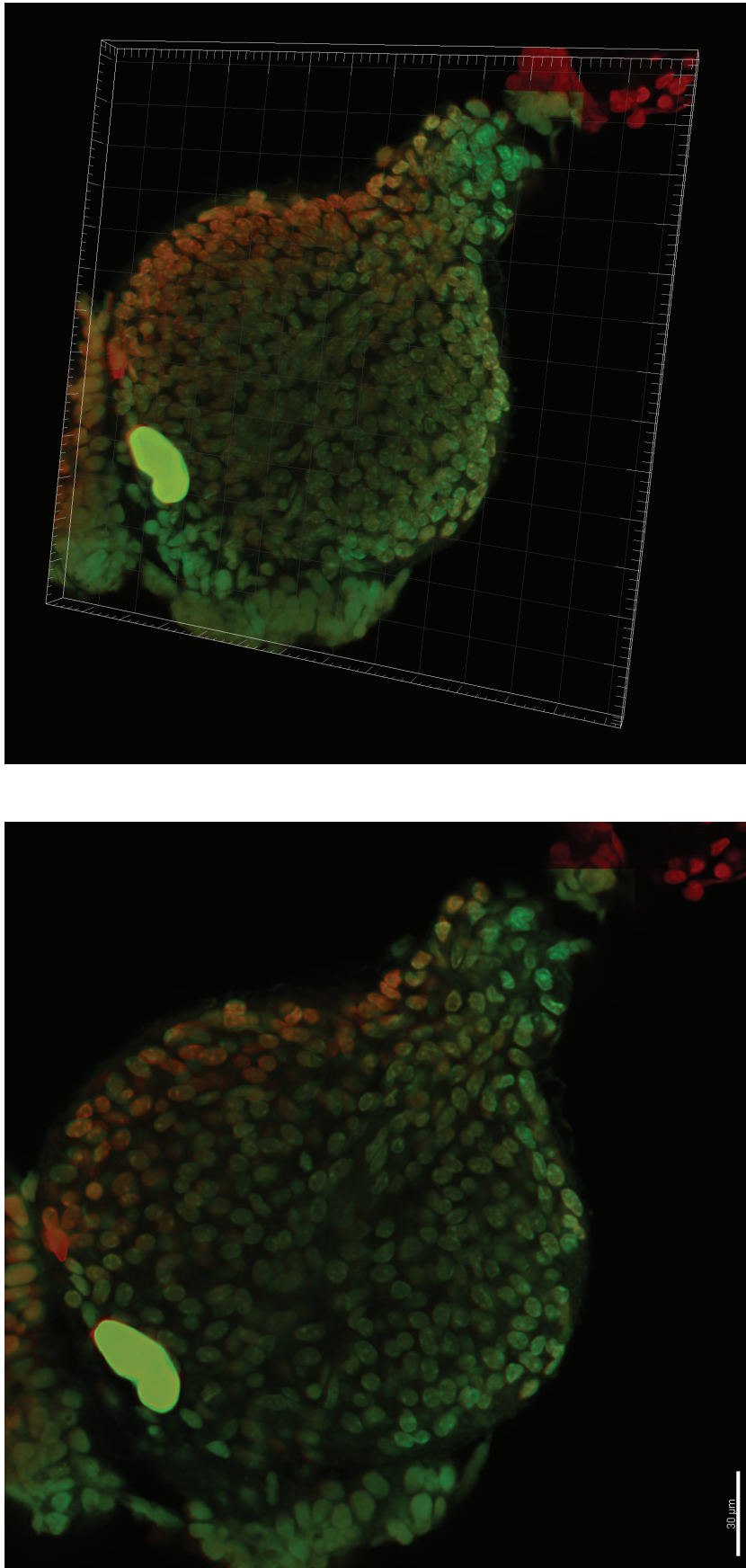


FIGURE 6.11 – Comptage des noyaux d'une papille folliculaire  $P_{26} +/+$

La technique de détection de « spots » du logiciel *Bitplane Imaris<sup>TM</sup>* permet de dénombrer les noyaux. Des vérifications et corrections éventuelles du comptage peuvent être effectuées par ajout ou suppression de sphères.



(a) Vue en coupe

(b) Vue 3D

FIGURE 6.12 – **Recalage des volumes *recto* et *verso* d'une papille folliculaire  $P_{40}$  -/-**  
Superposition des images médianes à gauche et vue en 3D des sous-volumes *recto* et *verso* recalés.

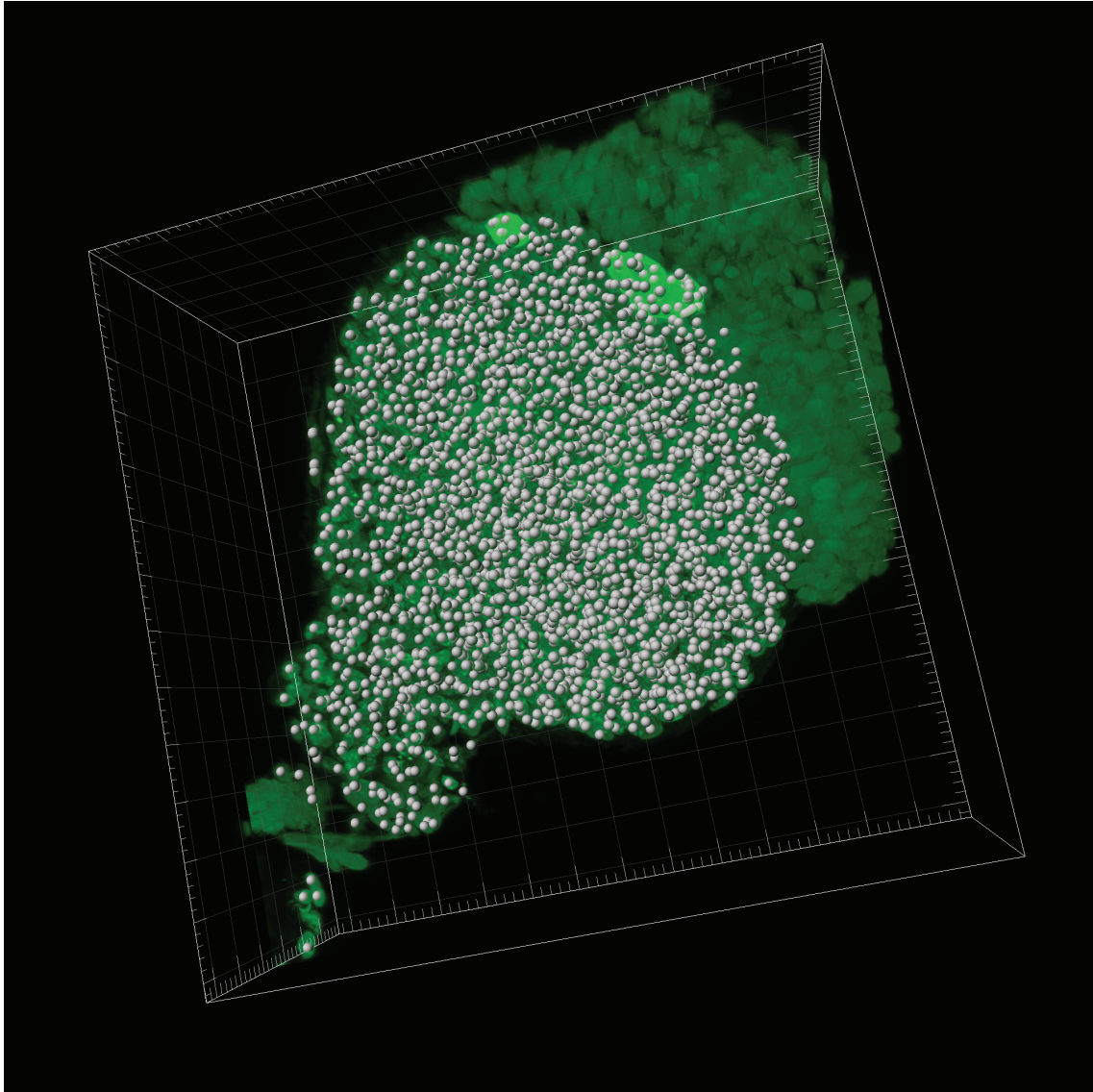


FIGURE 6.13 – **Comptage des noyaux d'une papille folliculaire  $P_{40}$  -/-**

Les noyaux épithéliaux détectés par la technique de détection de « spots » (et donc comptabilisés) peuvent être déduits du comptage en supprimant manuellement les sphères qui leur sont associées. A noter la présence de flashes lumineux au niveau du marquage, nécessitant également une correction au niveau du nombre de noyaux détectés. Ce phénomène de flash lumineux ne s'est plus reproduit par la suite.

# 7

## Perspectives et conclusions

La méthode mise en place dans le cadre de ce travail de thèse est relativement complexe en regard de la simplicité de la question biologique. Elle constitue cependant la meilleure approche possible si l'on souhaite un résultat avec une précision fine. Le contrôle visuel que l'on peut ainsi effectuer après comptage automatique, et la correction manuelle possible des erreurs de détection, rend la méthode plus exacte, par comparaison avec d'autres techniques. Les particularités intrinsèques du sujet d'étude font qu'au demeurant d'autres techniques existantes (FACS, quantification ADN/protéines, coupes histologiques...) donneraient des résultats trop approximatifs, du fait de la technique elle-même, mais aussi surtout par les complications de manipulations expérimentales qu'engendre la singularité de la papille folliculaire.

La méthode développée dépend grandement de la qualité des images. En ce sens, le microscope confocal n'est pas forcément le meilleur choix possible pour obtenir des images de qualité, en termes de simplicité et de durée expérimentale. Si l'information que l'on souhaite récupérer impose une utilisation de la fluorescence afin de pouvoir reconstituer finalement le volume de la papille folliculaire, une amélioration liée au niveau de l'instrument de microscopie utilisé peut être éventuellement possible. En ce sens, des essais d'acquisition sur de nouveaux instruments de microscopie, aujourd'hui à disposition, tels que le microscope multiphoton ou le wide-field, sont envisageables, ce qui ne pouvait pas l'être au commencement de ce travail. Cependant, seuls des essais expérimentaux répétés peuvent permettre de déterminer si ces instruments se révèlent au final plus adéquats, car chaque type de microscope possède logiquement ses propres caractéristiques limitantes (objectifs, excitation, filtrage de l'émission...). Pour le wide-field par exemple, la longueur d'onde unique d'excitation du fluorochrome peut s'avérer suboptimale pour le marqueur choisi.

Le recalage manuel donne actuellement un résultat considéré comme exact pour le comptage nucléaire. En ce sens, le recalage automatique n'apporte que très peu de gain supplémentaire au niveau de la minimisation de l'erreur de comptage commise à l'interface du recollement des deux volumes d'images. Par contre, un affinage du recalage automatique peut apporter une information volumique qui n'est actuellement pas correcte si on effectue qu'un recalage manuel. D'autres informations telles que la localisation cellulaire et la vascularisation au niveau de la papille folliculaire pourraient en bénéficier. Par conséquent, le processus de recalage nécessite actuellement quelques investigations supplémentaires afin d'améliorer la

qualité de l’alignement final, sa robustesse et sa vitesse de convergence. Dans ce but, il s’avère essentiel de déterminer le nombre d’images minimal à sélectionner pour chacun des sous-volumes *recto* et *verso* afin d’obtenir un recalage visuellement parfait. En l’état actuel, pour des acquisitions où l’angle entre le montage et la ligne du laser devient important (au-delà de  $5^\circ$ ), le nombre actuellement utilisé de 21 images se révèle insuffisant. Parallèlement, afin d’améliorer la robustesse et la vitesse de convergence, une approche multi-résolution peut être réintroduite dans l’algorithme du recalage. Celle-ci a déjà été implémentée par le passé dans ce travail, et consistait à travailler avec une pyramide d’images : le recalage débutait avec des copies d’images en résolution plus faible pour travailler avec des images de résolution croissante et terminer avec les images originales en qualité maximale. Cette approche permet d’être plus robuste aux perturbations qui peuvent affecter le recalage et de converger plus rapidement vers la solution. En outre, cela permet de garantir une convergence vers une solution optimale même dans le cas où l’initialisation de la transformation est moins précise que de coutume pour les valeurs choisies. Enfin, l’introduction d’un certain parallélisme (multi-threading) au niveau des calculs de la métrique et de l’interpolation, par exemple, peut également apporter un gain de performances important, exploitant ainsi pleinement les processeurs multicœurs de la station de travail.

La méthode développée dans le cadre de ce travail de thèse a pour but de déterminer s’il existe une différence dans le nombre de noyaux de papilles folliculaires de souris *Fgf5*  $+/+$  et *Fgf5*  $-/-$ . Les résultats biologiques actuellement obtenus sont une première estimation du nombre de noyaux de la papille folliculaire au déclenchement de la phase catagène. Les résultats statistiques ne permettant pas actuellement de démontrer une différence significative, et la constance du nombre de noyaux n’étant pas indubitable, il est nécessaire d’augmenter le nombre d’échantillons analysés afin de pouvoir se prononcer sans équivoque en faveur de l’une des trois hypothèses précédemment énoncées (c.f. ‘[Présentation de la problématique](#)’, page 8). En outre, afin de mieux comprendre le mode d’action de FGF5, un dénombrement en d’autres points temporels pour chacun des types ( $P_1$   $+/+$ ,  $P_1$   $-/-$ ,  $P_8$   $+/+$ ,  $P_8$   $-/-$ ,  $P_{26}$   $-/-$ ,  $P_{40}$   $+/+$ ), en plus des points temporels déjà analysés ( $P_{26}$   $+/+$ ,  $P_{40}$   $-/-$ ), est indispensable<sup>1</sup>.

Le récepteur de FGF5, FGFR1, se situe dans la papille folliculaire et l’expression de FGF5 est notamment concentrée dans les cornes (c.f. figure 2.3(c), page 10). FGF5 a clairement une influence sur la papille folliculaire, dont l’action visible se traduit par une différence de volume de celle-ci lorsque les deux allèles sont désactivés. On sait aussi que les cellules progénitrices à l’origine des cellules différenciées de la gaine épithéliale interne et de la tige pileuse sont organisées en une couche germinative entourant la papille folliculaire et réparties en trois compartiments non communicants [10]. Sachant, d’après les résultats de Cécile Kédzia, que la couche corticale comporte moins de cellules dans le cas homozygote (c.f. figure 2.6, page 12), on peut imaginer que FGF5 joue un rôle indirect au niveau des cellules progénitrices situées dans le compartiment à l’origine du cortex. Par indirect, on entend une action de FGF5 sur la papille folliculaire, qui en retour joue un rôle signalétique influençant les cellules du cortex (c.f. figure 7.1, page 79). Ce schéma de fonctionnement est d’autant plus renforcé qu’il est avéré que le diamètre de la papille est corrélé avec celui de la tige pileuse [5] — donc les cellules corticales — et que la papille joue un rôle inducteur au niveau du follicule pileux [17].

Les dénombrements nucléaires obtenus par cette méthode vont jouer également un rôle au niveau des investigations expérimentales à venir. En effet, l’analyse par microarray de l’expression génique comparée de populations cellulaires issues d’échantillons de follicules de vibrisse sauvages (*Fgf5*  $+/+$ ) versus homozygotes (*Fgf5*  $-/-$ ) est planifiée. L’information résultant du comptage nucléaire peut ainsi permettre de cibler si les futures recherches expérimentales à partir de l’analyse bioinformatique du microarray doivent se concentrer sur des gènes impliqués dans la constitution de la matrice extracellulaire produite par les cellules de la papille folliculaire ou sur des facteurs jouant un rôle dans la prolifération de ces cellules.

La méthode proposée constitue donc une alternative lorsque l’épaisseur ou la densité d’un échantillon

---

1. Prélèvements et acquisitions effectuées, analyses en cours



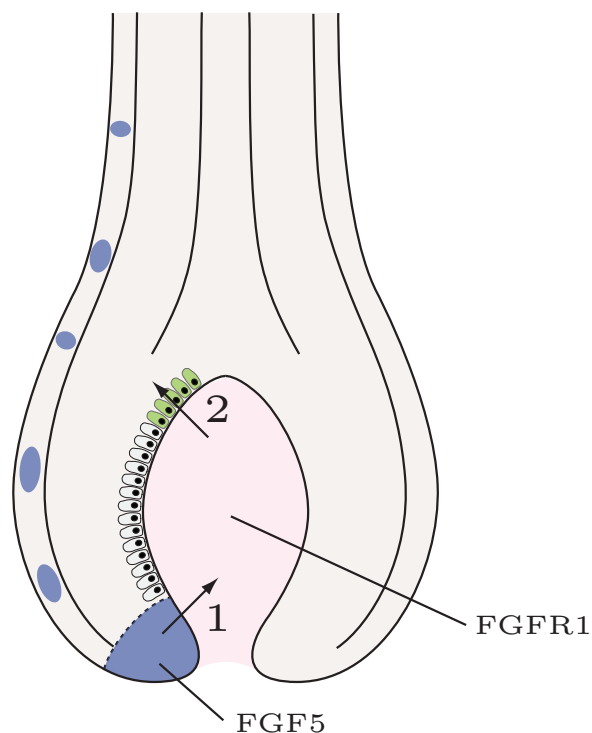


FIGURE 7.1 – **Hypothèse sur le mode d'action de FGF5**

FGF5 est exprimé de manière conséquente au niveau des « cornes », la partie la plus extrême de la matrice. Le récepteur à FGF5 se trouvant dans la papille folliculaire, FGF5 influence directement celle-ci (1). La papille folliculaire en réponse produit une action (2) sur les cellules progénitrices à l'origine des cellules différenciées du cortex.

(tissu, structure) ne permet pas son acquisition intégrale en une seule fois avec des instruments de microscopie à fluorescence (villosités intestinales, embryologie, îlots de Langerhans dans le pancréas. . .). L'innervation, la vascularisation ou encore l'adhésion cellulaire d'un tissu peuvent ensuite être étudiées spatialement à l'aide d'une reconstruction tridimensionnelle à partir du volume d'image de l'échantillon ainsi reconstitué. Cette méthode se veut donc plus précise et plus riche au niveau de l'information récoltée que d'autres techniques, telle une coupe histologique avec un immunomarquage par exemple.



# Liste des illustrations

1.1	Arrangement des follicules de vibrisse sur le museau (Oliver, 1966)	2
1.2	Le follicule pileux	3
1.3	Cycle pileux des follicules de pelage	5
1.4	Cycle pileux des follicules de vibrisse	5
2.1	Souris sauvage et souris homozygote	7
2.2	Motif d'expression temporelle de <i>Fgf5</i>	9
2.3	Motif d'expression temporelle de <i>Fgf5</i> sur coupes de follicule de vibrisse	10
2.4	Influence de l'expression de <i>Fgf5</i> sur le cycle pileux	11
2.5	Dimensions pileux au cours du temps	11
2.6	Densité des cellules corticales	12
2.7	Diamètre de la papille selon le génotype	12
3.1	Principe du microscope confocal	14
3.2	Concept de la transformation à rechercher	16
4.1	Interface graphique de visualisation et de sélection des images	22
4.2	Interface graphique du recalage manuel	23
4.3	Interface graphique d'édition des paramètres initiaux	24
4.4	Interface graphique d'édition des paramètres finaux	24
5.1	Processus d'expérimentation	28
5.2	Densité cellulaire de la matrice	30
5.3	Processus d'extraction de la papille folliculaire	31
5.4	Papille folliculaire dans un montage conventionnel sur lame	32
5.5	Acquisition entière de l'échantillon	34
5.6	Principe de l'acquisition <i>recto-verso</i>	35
5.7	Schéma et photo du montage	35
5.8	Courbes d'excitation du <i>DRAQ5<sup>TM</sup></i>	37
5.9	Courbe d'émission du <i>DRAQ5<sup>TM</sup></i>	38
5.10	Augmentation du zoom par rotation du champ de vision	41
5.11	Intensité des pixels en fonction de la quantité de signal fluorescent	42
5.12	Réglage du gain et de l'offset	43
5.13	Réglage de la phase	46
5.14	Amélioration de la résolution grâce à la déconvolution	47
5.15	Diagramme de l'implémentation du processus de recalage	49
5.16	Superposition des images médianes	52
5.17	Principe du recalage manuel	53

5.18	Compositions de rotations et symétries en 2D et 3D . . . . .	54
5.19	Principe de l'initialisation de la transformation . . . . .	55
5.20	Effet du changement des coordonnées . . . . .	56
5.21	Détection de noyaux . . . . .	57
6.1	Sélection des images des sous-piles pour le recalage . . . . .	60
6.2	Images des sous-volumes <i>recto</i> et <i>verso</i> . . . . .	61
6.3	Recalage manuel pour l'initialisation du recalage . . . . .	62
6.4	Étude du comportement de la métrique pour $R_{O_x} \circ R_{O_y}$ . . . . .	63
6.5	Étude du comportement de la métrique pour $T_{O_x} + T_{O_y}$ . . . . .	65
6.6	Étude du comportement de la métrique pour $T_{O_x} + T_{O_z}$ . . . . .	66
6.7	Valeurs calculées au cours du processus de recalage . . . . .	68
6.8	Détection des noyaux sur volumes entier et commun . . . . .	70
6.9	Histogramme comparé du nombre de noyaux de la papille folliculaire à l'entrée en phase catagène . . . . .	72
6.10	Recalage des volumes <i>recto</i> et <i>verso</i> d'une papille folliculaire $P_{26} +/+$ . . . . .	73
6.11	Comptage des noyaux d'une papille folliculaire $P_{26} +/+$ . . . . .	74
6.12	Recalage des volumes <i>recto</i> et <i>verso</i> d'une papille folliculaire $P_{40} -/-$ . . . . .	75
6.13	Comptage des noyaux d'une papille folliculaire $P_{40} -/-$ . . . . .	76
7.1	Hypothèse sur le mode d'action de FGF5 . . . . .	79

## Liste des tables

5.1	Ouvertures et fermetures des PMTs conseillées en fonction des lasers . . . . .	39
5.2	Tailles de voxels recommandées . . . . .	40
5.3	Tailles de voxels recalculées . . . . .	40
6.1	Décompte pour la validation du comptage . . . . .	69
6.2	Décompte pour l'application biologique . . . . .	71



# Références bibliographiques

## Biologie

- [1] P. Davidson and M.H. Hardy. The development of mouse vibrissae in vivo and in vitro. *J. Anat.*, 86 :342–355, 1952.
- [2] A. Delacour. *Contribution à l'étude du développement et du renouvellement des follicules pileux*. PhD thesis, Paris VII, 2001.
- [3] J. Dörlf. The innervation of the mystical region of the white mouse. a topographical study. *J. Anat.*, 142 :173–184, 1985.
- [4] FW Dry. The coat of the mouse (mus musculus). *J. Genet.*, 16 :287–340, 1926.
- [5] K. Elliott, T. J. Stephenson, and A. G. Messenger. Differences in hair follicle dermal papilla volume are due to extracellular matrix volume and cell number : implications for the control of hair follicle size and androgen responses. *J Invest Dermatol*, 113(6) :873–7, 1999.
- [6] J. M. Hebert, T. Rosenquist, J. Gotz, and G. R. Martin. Fgf5 as a regulator of the hair growth cycle : evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*, 78(6) :1017–25., 1994.
- [7] L. Ibrahim and E. A. Wright. A quantitative study of hair growth using mouse and rat vibrissal follicles. i. dermal papilla volume determines hair volume. *J Embryol Exp Morphol*, 72 :209–24, 1982.
- [8] C. Ito, Y. Saitoh, Y. Fujita, Y. Yamazaki, T. Imamura, S. Oka, and S. Suzuki. Decapeptide with fibroblast growth factor (fgf)-5 partial sequence inhibits hair growth suppressing activity of fgf-5. *J Cell Physiol*, 197(2) :272–83, 2003.
- [9] C. Kédzia. *Contribution à l'étude de la régulation du cycle pileux : rôle des cellules souches et du facteur de croissance des fibroblastes FGF-5*. PhD thesis, Paris VI, 1998.
- [10] E. Legué and J.-F. Nicolas. Hair follicle renewal : organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Development*, 132(18) :4143–4154, 2005.
- [11] W. Montagna and E.J. Van Scott. The anatomy of the hair follicle. In W. Montagna and R.A. Elis, editors, *Biology of hair growth in the mouse*. Academic Press, New York, 1962.
- [12] R. F. Oliver. Whisker growth after removal of the dermal papilla and lengths of follicle in the hooded rat. *J Embryol Exp Morphol*, 15(3) :331–47, 1966.
- [13] H. Oshima, A. Rochat, C. Kedzia, K. Kobayashi, and Y. Barrandon. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 104(2) :233–45., 2001.
- [14] Y. Ota, Y. Saitoh, S. Suzuki, K. Ozawa, M. Kawano, and T. Imamura. Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1) :169–76, 2002.
- [15] R. Paus and K. Foitzik. In search of the "hair cycle clock" : a guided tour. *Differentiation*, 72(9-10) :489–511, 2004.

- [16] A. Petho-Schramm, H. J. Muller, and R. Paus. Fgf5 and the murine hair cycle. *Arch Dermatol Res*, 288(5-6) :264–6, 1996.
- [17] A. J. Reynolds and C. A. Jahoda. Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. *Development*, 115(2) :587–93., 1992.
- [18] A. J. Reynolds, C. Lawrence, P. B. Cserhalmi-Friedman, A. M. Christiano, and C. A. Jahoda. Transgender induction of hair follicles. *Nature*, 402(6757) :33–4, 1999.
- [19] F.L. Rice, A. Mance, and B.L. Munger. A comparative light microscopic analysis of the sensory innervation of the mystical pad. i. innervation of vibrissal follicle-sinus complexes. *J. Comp. Neurol.*, 252 :154–174, 1986.
- [20] S. Suzuki, T. Kato, H. Takimoto, S. Masui, H. Oshima, K. Ozawa, S. Suzuki, and T. Imamura. Localization of rat fgf-5 protein in skin macrophage-like cells and fgf-5s protein in hair follicle : possible involvement of two fgf-5 gene products in hair growth cycle regulation. *J Invest Dermatol*, 111(6) :963–72, 1998.
- [21] S. Suzuki, Y. Ota, K. Ozawa, and T. Imamura. Dual-mode regulation of hair growth cycle by two fgf-5 gene products. *J Invest Dermatol*, 114(3) :456–63, 2000.

## Microscopie

- [22] Alan R. Hibbs. *Confocal microscopy for biologists*. Kluwer Academic, New York, 2004.
- [23] K. Konig. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc*, 200(Pt 2) :83–104, 2000.
- [24] Barry R. Masters. *Confocal microscopy and multiphoton excitation microscopy the genesis of live cell imaging*. SPIE Press, Bellingham, Wash., 2006.
- [25] James B. Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer, New York, 3rd edition, 2006.

## Informatique

- [26] L.G. Brown. A survey of image registration techniques. *ACM Computing Surveys*, 24(4) :325–376, 1992.
- [27] T. Buzug and J. Weese. Improving DSA images with an automatic algorithm based on template matching and an entropy measure. In H. U. Lemke, M. W. Vannier, K. Inamura, and A. G. Farman, editors, *Computer Assisted Radiology*, volume 1124 of *Excerpta Medica-Int. Congress Series*, pages 145–150, Amsterdam, 1996. Elsevier.
- [28] G. E. Christensen, A. A. Kane, J. L. Marsh, and M. W. Vannier. Synthesis of an individual cranial atlas with dysmorphic shape. In *Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis*, pages 309–318, Los Alamitos, CA, 1996. IEEE Computer Society Press.
- [29] O. Cuisenaire, J.-P. Thiran, B. Macq, C. Michel, A. De Volder, and F. Marquès. Automatic registration of 3D MR images with a computerized brain atlas. In M.H. Loew and K.M. Hanson, editors, *Medical Imaging*, volume 2710, pages 438–448, Bellingham, WA., 1996. SPIE Press.
- [30] M. Irani and P. Anandan. Robust multi-sensor image alignment. In *ICCV*, pages 959–966. IEEE Computer Society, 1998.
- [31] F. Maes, A. Collignon, D. Vandermeulen, G. Marchal, and P. Suetens. Multimodality image registration by maximization of mutual information. In *Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis*, pages 14–22, Los Alamitos, CA, 1996. IEEE Computer Society Press.



- [32] F. Maes, A. Collignon, D. Vandermeulen, G. Marchal, and P. Suetens. Multimodality image registration by maximization of mutual information. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 16(2) :187–198, April 1997.
- [33] A. Papoulis. *Probability, random variables, and stochastic processes*. McGraw-Hill, New York, N.Y., third edition, 1991.
- [34] C. Perault, H. Wampach, and J. Liehn. Three dimensional SPECT myocardial rest-stress subtraction images after automated registration and normalization. In Y. Bizais, C. Barillot, and R. Di Paola, editors, *Information Processing in Medical Imaging*, pages 391–392, Dordrecht, 1995. Kluwer Academic Publishers.
- [35] P. Pokrandt. Fast non-supervised matching : a probabilistic approach. In H. U. Lemke, M. W. Vannier, K. Inamura, and A. G. Farman, editors, *Computer Assisted Radiology*, volume 1124 of *Excerpta Medica-Int. Congress Series*, pages 306–310, Amsterdam, 1996. Elsevier.
- [36] W. K. Pratt. *Digital image processing (2nd ed.)*. John Wiley & Sons, Inc., 1991. 130597.
- [37] A. Rosenfeld and A.C. Kak. *Digital Picture Processing*, volume I and II. Academic Press, Orlando, Fla, second edition, 1982.
- [38] C. Studholme, D. L. G. Hill, and D. J. Hawkes. Incorporating connected region labelling into automated image registration using mutual information. In *Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis*, pages 23–31, Los Alamitos, CA, 1996. IEEE Computer Society Press.
- [39] P.A. Van Den Elsen, E.-J.D. Pal, and M.A. Viergever. Medical image matching - a review with classification. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 12(1) :26–39, 1993.
- [40] P. Viola, N. N. Schraudolph, and T. J. Sejnowski. Empirical entropy manipulation for real-world problems. In D.S. Touretzky, M.C. Mozer, and M.E. Hasselmo, editors, *Advances in Neural Information Processing Systems*, volume 8, pages 851–857. The MIT Press, 1996.
- [41] P. Viola and W.M. Wells. Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision*, 24(2) :137–154, 1997.
- [42] P. Viola and W. M. Wells III. Alignment by maximization of mutual information. In *Int. Conf. on Computer Vision*, pages 16–23, Los Alamitos, CA, 1995. IEEE Computer Society Press.
- [43] P.A. Viola. *Alignment by Maximization of Mutual Information*. PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology, Artificial Intelligence Laboratory, MA, 1995.
- [44] W. M. Wells III, P. Viola, H. Atsumi, S. Nakajima, and R. Kikinis. Multi-modal volume registration by maximization of mutual information. *Medical Image Analysis*, 1 :35–51, 1997.
- [45] W.M. Wells III, P. Viola, and R. Kikinis. Multi-modal volume registration by maximization of mutual information. In *Medical Robotics and Computer Assisted Surgery*, pages 55–62, New York, 1995. Wiley.
- [46] B. Zitova and J. Flusser. Image registration methods : a survey. *Image and Vision Computing*, 21(21) :977–1000, 2003.
- [47] T. Zuk, S. Atkins, and K. Booth. Approaches to registration using 3D surfaces. In M. H. Loew, editor, *Medical Imaging : Image Processing*, volume 2167, pages 176–187, Bellingham, WA, 1994. SPIE Press.



## Taille du voxel selon Bitplane

La taille du voxel idéal selon Bitplane en 2006, pour leur logiciel Imaris, se définit comme suit :

$$res(x, y, z) = \left( \frac{\lambda_{em}}{4\eta_{med} \cdot \sin(\alpha)}, \frac{\lambda_{em}}{4\eta_{med} \cdot \sin(\alpha)}, \frac{\lambda_{em}}{4\eta_{med} \cdot (1 - \cos(\alpha))} \right) \quad (7.1)$$

$$\text{avec } \alpha = \arcsin\left(\frac{n_A}{\eta_{med}}\right), \quad n_A = 0.7, \quad \eta_{med} = 1.33$$



Nicolas Fête  
Chantemerle 6  
1024 Ecublens, Switzerland  
Mobile: +41 78 843 63 96  
Email: nicolas@fete.ch

05.09.1976  
Single  
Swiss  
Military obligations

OBJECTIVE: TO IMPROVE THE SYNERGY BETWEEN BIOLOGY AND COMPUTER SCIENCE FIELDS IN  
A CROSSDISCIPLINARY BIOLOGICAL PROJECT

## EDUCATION

---

2008 **Swiss Federal Institute of Technology (EPFL), Lausanne, Switzerland**  
PhD in Developmental Biology and Neurosciences

2003 **Swiss Federal Institute of Technology (EPFL), Lausanne, Switzerland**  
Bachelor and Master's Degree in Computer Science

## WORK EXPERIENCE

---

2003 - 2008 **Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Switzerland – PhD Student  
Stem Cells Dynamics Laboratory (LDCS)**  
Developed a method for thick samples confocal imaging, in order to answer a biological question. Involved Biology, Confocal Microscopy and Computer Science skills

2000 - 2003 **EPFL/LITH laboratory – Developer**  
Developed a web interface for e-learning project *Emersion*, based on Matlab simulations

2000 - 2003 **EPFL/LAP laboratory – Assistant**  
Assisted three academic courses, *Computer Processors Design, Computers Architecture, and Computer Hardware*

## LANGUAGES

---

**French, Italian** Mother tongue  
**English** Fluent (C1 of the European standards of languages)  
**German** Basic knowledge (B2 of the European standards of languages)

## VOLUNTEER EXPERIENCE

---

2003 - present **Internet website designer and manager**  
Creating and administrating internet websites, especially laboratory ([cellules-souches.eu](http://cellules-souches.eu)) and Unitech Corporation ([unitech.dj](http://unitech.dj), Event agency) websites

2003 - 2008 **UNIL - EPFL University Sports Center**  
Part-time in charge of cardio training and muscular strengthening course. ~100 people

## INTERESTS AND ACTIVITIES

---

Music Played the piano for 14 years at Conservatoire de Musique de Genève  
Sport Played tennis in competition during high school. Regional level R5  
Couple dancing since 2001 (rock, salsa, discofox, latin dances)

## PUBLICATIONS AND AWARDS

---

The View of the Future Poster Prize, CHUV Research Day 2008 « Regenerative Medicine »  
Best Poster Award, USGEB 2008 « Biology meets engineering », Symposium Bioimaging