
Détection de spots avec sélection d'échelle automatique et seuillage adaptatif en microscopie de fluorescence*

Antoine Basset¹, Jérôme Boulanger², Patrick Bouthemy¹,
Charles Kervrann¹, Jean Salamero²

1. Inria, Centre Rennes Bretagne Atlantique, Campus Universitaire de Beaulieu
35042 Rennes Cedex

{antoine.basset,patrick.bouthemy,charles.kervrann}@inria.fr

2. CNRS, Institut Curie, UMR 144, 12 rue Lhomond, 75005 Paris

{jerome.boulanger,jean.salamero}@curie.fr

RÉSUMÉ. En imagerie cellulaire, et plus particulièrement en microscopie de fluorescence, la première phase de beaucoup d'analyses consiste à détecter des éléments intra-cellulaires d'intérêt, comme des protéines ou des vésicules. De nombreuses méthodes de détection ont été développées dans ce contexte, mais elles réclament souvent un paramétrage assez fin et ne peuvent pas toujours s'adapter à l'échelle des éléments à détecter. Nous proposons une méthode incluant une sélection d'échelle automatique précise et un seuillage localement adapté. La méthode fournit de plus le support spatial effectif des éléments détectés, qui ne sont pas nécessairement circulaires. Des expérimentations quantitatives sur images simulées montrent les avantages et les meilleures performances de notre méthode. Des résultats sur séquences réelles confirment son intérêt.

ABSTRACT. In live cell and fluorescence microscopy, the first step of the analysis often consists in detecting a large amount of elements (molecules, vesicles). Many detection methods have been developed to this purpose, but they often need a fine tuning stage and cannot automatically fit the object scale. We propose a detection method with an accurate automatic scale selection and a locally adapted thresholding. Moreover, the method provides the spatial support of the detected elements, which are not necessarily circular. Quantitative experiments on synthetic sequences demonstrate the advantages and better performance of our method. Its interest is confirmed by results on real sequences.

MOTS-CLÉS : microscopie TIRF, détection, sélection d'échelle, seuillage adaptatif.

KEYWORDS: TIRF microscopy, detection, scale selection, adaptive thresholding.

DOI:10.3166/TS.32.287-310 © 2015 Lavoisier

*. La thèse d'Antoine Basset bénéficie du soutien de la Région Bretagne.

1. Introduction et état de l'art

Dans le cadre de l'analyse d'images de microscopie optique, la détection automatisée des éléments d'intérêt constitue la plupart du temps une étape préliminaire essentielle qui conditionne l'ensemble de l'étude, que ce soit le suivi de vésicules (Meijering *et al.*, 2012), la caractérisation de dynamiques membranaires (Basset, Bouthemy *et al.*, 2014), ou la classification de mouvements (Sage *et al.*, 2005).

Intéressés par les dynamiques de trafic membranaire, nous cherchons à détecter des vésicules, qui sont des intermédiaires de transport de molécules. Pour cela, nous exploitons des séquences d'images acquises en microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) (Axelrod, 2008). Ces vésicules se présentent dans l'image comme des spots brillants, généralement de taille semblable, et il convient donc de détecter cette échelle caractéristique.

Nous proposons une méthode de détection de spots s'appuyant sur un filtre laplacien de gaussienne, dont l'échelle est automatiquement sélectionnée. Pour faire face aux grandes variations de contraste, nous utilisons un seuillage adaptatif. De plus, le seuil est déduit en chaque point d'une probabilité de fausse alarme. Contrairement à la plupart des méthodes de détection, notre méthode s'adapte donc automatiquement à la dynamique de l'image. Un exemple de détection de vésicules dans une image TIRF est donné à la figure 1.

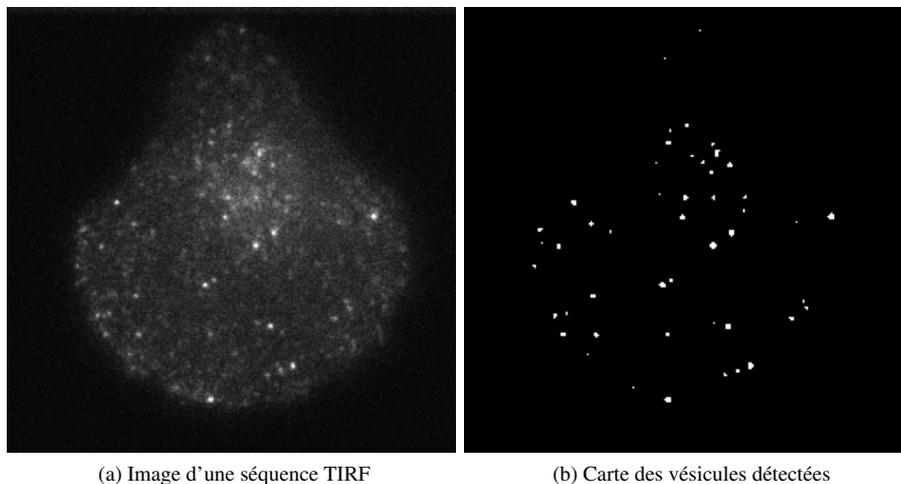


Figure 1. Détection de vésicules par notre méthode dans une image extraite d'une séquence de microscopie TIRF (la langérine est marquée par la pHLuorin dans une cellule M10)

Par ailleurs, nous avons construit un nouveau jeu de données très réaliste pour comparer les méthodes de détection de spots. Les performances de notre méthode

ont ainsi pu être évaluées et comparées objectivement et quantitativement à d'autres méthodes de détection à la pointe de l'état de l'art.

Une analyse très complète des principales approches de détection a été menée dans (Smal *et al.*, 2010). Une douzaine de méthodes ont été analysées et comparées sur des images de synthèse. Il en ressort que les méthodes de détection étudiées suivent le même schéma général : l'image est d'abord filtrée pour réduire le bruit et accentuer les spots, puis les valeurs extrêmes de l'image filtrée, correspondant aux spots, sont détectées.

Des études comparatives (Smal *et al.*, 2010 ; Rezatofighi *et al.*, 2012) ont permis d'évaluer les performances de nombreuses méthodes de détection non supervisées sur les images de synthèse précédemment évoquées. Il s'agit des méthodes par produit multi-échelle d'ondelettes (WMP (Olivo-Marín, 2002)), de détection multi-échelle après stabilisation de variance (MS-VST (Zhang *et al.*, 2007)), de filtrage par chapeau haut-de-forme (TH (Bright, Steel, 1987)) et chapeau haut-de-forme morphologique (MTH (Soille, 2003)), de détection de dômes ou *h-dome* (HD (Vincent, 1993)) et de dômes de hauteur maximale (MPHD (Rezatofighi *et al.*, 2012)), de détection après accentuation des spots (SEF (Sage *et al.*, 2005)), et d'extraction de points caractéristiques (IFD (Haar Romeny, 2003)). La plupart de ces méthodes comprennent plusieurs paramètres devant être finement réglés pour obtenir de bons résultats (Smal *et al.*, 2010 ; Rezatofighi *et al.*, 2012).

Afin de réduire le nombre et la sensibilité des paramètres, nous avons développé une première méthode de détection de vésicules avec sélection d'échelle automatique dénommée SLT-LoG et décrite dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b). Elle s'appuie sur un filtre de laplacien de gaussienne, dont la variance, ou *échelle*, est automatiquement sélectionnée dans un ensemble fini de valeurs prédéfinies. Un seuil local permet de décider en chaque pixel si celui-ci appartient ou non à une vésicule. Sous l'hypothèse d'une distribution localement gaussienne des intensités de l'image, le seuil est déduit d'une probabilité de fausse alarme (PFA), choisie par l'utilisateur.

Dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), la sélection d'échelle reposait sur un filtre gaussien échantillonné. Lindeberg (Lindeberg, 1993) a démontré que, dans le cadre des espaces multi-échelles, le rapport entre deux échelles successives de ce filtre doit être un entier impair. Le rapport minimal de 3 avait ainsi été retenu. Cependant, la conséquence en était une estimation trop grossière de l'échelle, provoquant des erreurs de détection lorsque de petits éléments se trouvent très proches les uns des autres dans l'image. Pour dépasser cette limitation, nous avons recours à un autre filtre pour construire l'espace multi-échelle, mieux adapté aux petits objets : le filtre discret analogue au filtre gaussien (Lindeberg, 1993). Il permet de choisir arbitrairement le rapport entre deux échelles successives testées, les propriétés d'espace multi-échelle étant conservées. À petite échelle cependant, son comportement, différent de celui du filtre échantillonné, impose une nouvelle stratégie de sélection d'échelle.

L'article est structuré comme suit. La section 2 décrit la construction de l'espace multi-échelle avec le filtre laplacien de gaussienne composé d'un noyau laplacien dis-

cret et d'un noyau analogue au filtre gaussien. Nous proposons deux critères de sélection d'échelle dans la section 3 avec une évaluation comparative. La section 4 introduit le seuillage local adaptatif pour la détection de vésicules. Des résultats sont décrits en section 5 sur des séquences générées permettant une évaluation comparative quantitative, et sur des séquences réelles de microscopie TIRF. Enfin, nous concluons en section 6.

2. Détection de blobs

Nous considérons une famille multi-échelle L_f d'une image f de domaine $\Omega \subset \mathbb{Z}^2$:

$$L_f: \quad \Omega \times \mathcal{S} \rightarrow \mathbb{R} \\ (x, y, s) \mapsto (K_s * K_s^T * f)(x, y) \quad (1)$$

où $*$ est l'opérateur de convolution, T l'opérateur de transposition et K_s un noyau de convolution 1D d'échelle s ($K_s * K_s^T$ est un noyau de convolution 2D séparable). Nous noterons $L_f(s)$ l'image filtrée à l'échelle s :

$$L_f(s): \quad \Omega \rightarrow \mathbb{R} \\ (x, y) \mapsto L_f(x, y, s). \quad (2)$$

Comme mentionné plus haut, dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), nous avons utilisé pour K_s le filtre gaussien échantillonné de variance s , simple à construire, mais qui ne peut être utilisé comme noyau multi-échelle que si les rapports d'échelles testées sont des entiers impairs (Lindeberg, 1993). En pratique, nous avons choisi $s \in \{1; 3; 9; 27; 81\}$.

Comme nous le verrons à la section 5, pour obtenir de bons résultats de détection, l'échelle du filtre doit être proche de la variance des spots à détecter si on assimile ces derniers à des spots de profil gaussien, ou légèrement supérieure si le niveau de bruit est élevé. Dans le but d'analyser le comportement de vésicules au sein de cellules dans des images acquises en microscopie TIRF, nous nous intéressons aux petites échelles. En effet, les vésicules ont généralement un diamètre apparent de quelques pixels, et peuvent également être distantes les unes des autres de quelques pixels. Afin de diminuer les erreurs de détection d'objets si rapprochés, nous devons pouvoir évaluer très précisément l'échelle de K_s . Pour obtenir un échantillonnage arbitrairement précis de l'échelle, le noyau de convolution doit être tel que la famille multi-échelle L_f respecte l'équation de la chaleur (Lindeberg, 1993) :

$$\frac{\partial L_f}{\partial s} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) L_f. \quad (3)$$

Dans un espace continu, le filtre gaussien en est solution. L'équivalent adéquat dans un espace discret (où les dérivées spatiales sont remplacées par des différences finies), comme une image numérique, est le filtre discret analogue au filtre gaussien (dénommé par la suite, pour simplifier, *gaussien discret*). Pour des échelles grandes,

le filtre gaussien échantillonné en est une bonne approximation car la différence finie est proche de la dérivée. Cependant, seul le noyau gaussien discret permet d'accéder à des échelles réelles $s \in \mathbb{R}_+$ arbitraires (Lindeberg, 1993). Il est défini ainsi :

$$\forall i \in \mathbb{Z}, K_s(i) = e^{-s} I_i(s), \quad (4)$$

où I_i est la fonction de Bessel modifiée d'ordre entier $i \in \mathbb{Z}$.

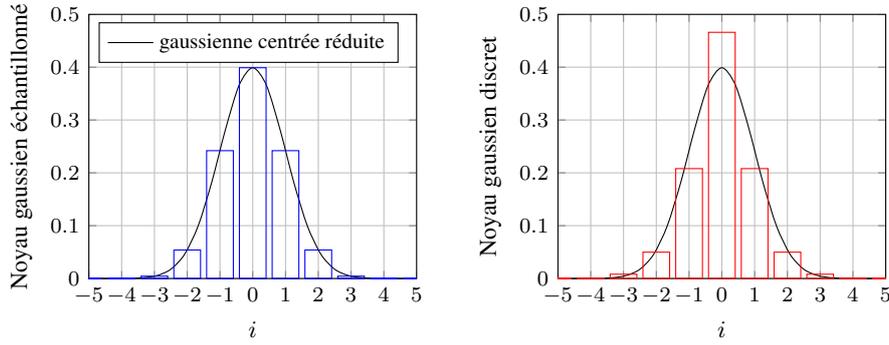


Figure 2. Comparaison entre les noyaux gaussiens échantillonné et discret d'échelle $s = 1$, et la fonction gaussienne de variance $\sigma^2 = 1$

La figure 2 illustre la différence entre les noyaux gaussiens échantillonné et discret à petite échelle. La différence la plus notable se trouve au centre du noyau ($i = 0$), où le noyau gaussien discret a une valeur plus élevée que le noyau gaussien échantillonné. Comme nous le verrons dans la section suivante, ceci impose une nouvelle stratégie de sélection d'échelle, qui se base sur les minima locaux, appelés blobs, du laplacien de gaussienne multi-échelle de l'image.

On définit H_f , le laplacien de gaussienne multi-échelle normalisé de f , de la façon suivante :

$$H_f: \Omega \times \mathcal{S} \rightarrow \mathbb{R} \\ (x, y, s) \mapsto (s \nabla^2 * L_f(s))(x, y), \quad (5)$$

où ∇^2 est le noyau laplacien discret isotrope (Lindeberg, 1993) :

$$\nabla^2 = \begin{pmatrix} 1/6 & 2/3 & 1/6 \\ 2/3 & -10/3 & 2/3 \\ 1/6 & 2/3 & 1/6 \end{pmatrix}. \quad (6)$$

Lindeberg définit un blob de f comme un extremum local de H_f (Lindeberg, 1993). Comme nous cherchons des spots brillants, et que l'opérateur laplacien de gaussienne est négatif, nous ne nous intéressons qu'aux *minima* locaux $b = (x_b, y_b, s_b)$:

$$b \text{ est un blob} \iff \forall (x, y, s) \in V(b), H_f(x_b, y_b, s_b) \leq H_f(x, y, s), \quad (7)$$

où $V(b)$ est un voisinage $3 \times 3 \times 3$ de b . On obtient un ensemble $\mathcal{B}(f) \subset \Omega \times \mathcal{S}$ de blobs. Notons $\mathcal{B}_s(f) = \{(x_b, y_b, s_b) \in \mathcal{B}(f) \mid s_b = s\}$ l'ensemble des blobs détectés à l'échelle s , et $|\mathcal{B}_s(f)|$ leur nombre.

3. Sélection de l'échelle

Dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), nous sélectionnions l'échelle, parmi celles testées, comprenant le plus grand nombre de blobs. La figure 3 illustre le nombre de blobs détectés aux échelles testées, selon le noyau utilisé, dans une image de synthèse contenant des spots de variance 16 px^2 (px désignant l'unité du pixel).

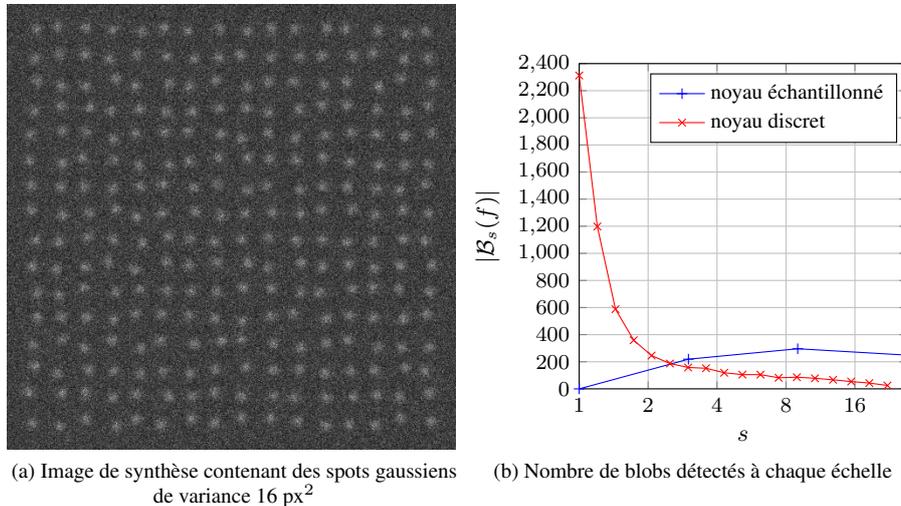


Figure 3. Nombre de blobs détectés en fonction de l'échelle avec les noyaux gaussiens discret et échantillonné

Le filtre optimal doit avoir une échelle de l'ordre de la variance des spots (Sage *et al.*, 2005), soit 16 px^2 pour l'exemple de la figure 3. Avec la méthode précédente (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), nous obtenions une échelle de 9 px^2 , qui est bien le multiple de 3 le plus proche de 16. Le filtre discret permet de tester des échelles arbitrairement rapprochées entre elles, et donc également plus proches de 16. Cependant, avec le critère de (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b) et un filtre gaussien discret, nous obtiendrions presque systématiquement la plus petite échelle testée. En fait, ce n'est pas la bonne approche pour ce filtre. Nous proposons donc une nouvelle stratégie de sélection d'échelle.

3.1. Nouveaux critères de sélection d'échelle

Un point de l'image f peut porter un blob avec une probabilité $p(b_s \mid f)$, ou ne pas le porter avec une probabilité $1 - p(b_s \mid f)$. Supposons que l'image f comprenne un

bruit additif gaussien ε , tel que $f = f_0 + \varepsilon$, où f_0 est l'image « vraie ». Certains blobs peuvent alors ne pas correspondre à des vésicules imagées, mais provenir du bruit ε . S'ils sont extraits par la méthode de détection, ce sont de fausses détections, ou « faux blobs ». Notons $p(b_s^\varepsilon | f)$ la probabilité qu'un point soit un faux blob. Inversement, dénommons « vrais blobs » ceux provenant de f_0 , et notons $p(b_s^0 | f)$ la probabilité qu'un point soit un vrai blob. Nous proposons deux critères de sélection d'échelle :

$$s^* = \arg \max_s p(b_s^0 | f) \quad (\text{critère } C_1); \quad (8)$$

$$s^* = \arg \min_s \frac{p(b_s^\varepsilon | f)}{p(b_s^0 | f)} \quad (\text{critère } C_2). \quad (9)$$

C_1 maximise la probabilité de vraies détections, et C_2 minimise la proportion de fausses détections.

En raison de la faible densité de vésicules dans l'image, on peut considérer que l'intersection des événements est rare ; ainsi, $p(b_s^0 | f) \approx p(b_s | f) - p(b_s^\varepsilon | f)$. De plus, on peut approcher $p(b_s | f)$ empiriquement par $|\mathcal{B}_s(f)|/\mathcal{A}_f$, où \mathcal{A}_f est le nombre de pixels de f . Il reste à estimer $p(b_s^\varepsilon | f) \approx p(b_s^\varepsilon | \varepsilon)$. Nous pourrions estimer ε en débruitant f , mais afin de garder une méthode simple et efficace, nous préférons simuler ε . Nous pouvons nous ramener à un bruit gaussien centré réduit, car l'ensemble des blobs est invariant par changement linéaire de contraste :

$$\forall \mu_\varepsilon \in \mathbb{R}, \sigma_\varepsilon \in \mathbb{R}_+^*, \mathcal{B}((\varepsilon - \mu_\varepsilon)/\sigma_\varepsilon) = \mathcal{B}(\varepsilon). \quad (10)$$

PREUVE 1. — Soit μ_ε la moyenne et σ_ε l'écart-type de ε . Par souci de simplicité, nous noterons également μ_ε l'image dont tous les pixels valent μ_ε . Soit $b = (x_b, y_b, s_b)$ un blob de ε , et prenons $(x, y, s) \in V(b)$.

D'après (7), $H_\varepsilon(x, y, s) > H_\varepsilon(x_b, y_b, s_b)$.

Puisque $\sigma_\varepsilon > 0$,

$$\frac{H_\varepsilon(x, y, s) - H_{\mu_\varepsilon}(x, y, s)}{\sigma_\varepsilon} > \frac{H_\varepsilon(x_b, y_b, s_b) - H_{\mu_\varepsilon}(x_b, y_b, s_b)}{\sigma_\varepsilon}.$$

Alors, par linéarité de $s\nabla^2$ et K_s ,

$$H_{(\varepsilon - \mu_\varepsilon)/\sigma_\varepsilon}(x, y, s) > H_{(\varepsilon - \mu_\varepsilon)/\sigma_\varepsilon}(x_b, y_b, s_b).$$

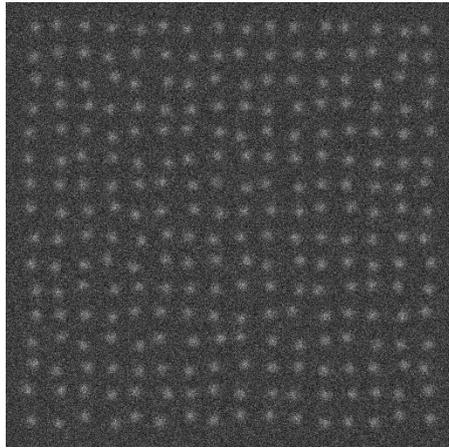
Ainsi, b est également un blob de l'image $(\varepsilon - \mu_\varepsilon)/\sigma_\varepsilon$. On en déduit que $\mathcal{B}(\varepsilon) \subset \mathcal{B}((\varepsilon - \mu_\varepsilon)/\sigma_\varepsilon)$. Par un raisonnement analogue, on obtient $\mathcal{B}((\varepsilon - \mu_\varepsilon)/\sigma_\varepsilon) \subset \mathcal{B}(\varepsilon)$. Finalement, $\mathcal{B}((\varepsilon - \mu_\varepsilon)/\sigma_\varepsilon) = \mathcal{B}(\varepsilon)$. ■

Nous modélisons alors la probabilité de détecter un faux blob dans l'image f par : $\forall s \in \mathbb{R}_+^*, p(b_s^\varepsilon | f) \approx |\mathcal{B}_s(\tilde{\varepsilon})|/\mathcal{A}_{\tilde{\varepsilon}}$, où $\tilde{\varepsilon}$ est une image aléatoire gaussienne centrée réduite. Pour limiter l'effet du bruit de quantification (le comptage du nombre fini de blobs), $\mathcal{A}_{\tilde{\varepsilon}}$ doit être élevé. Nous utilisons une image $\tilde{\varepsilon}$ de taille 4096×4096 pixels. Dans nos expériences, les résultats de détection ne sont pas améliorés si nous augmentons davantage la taille de $\tilde{\varepsilon}$.

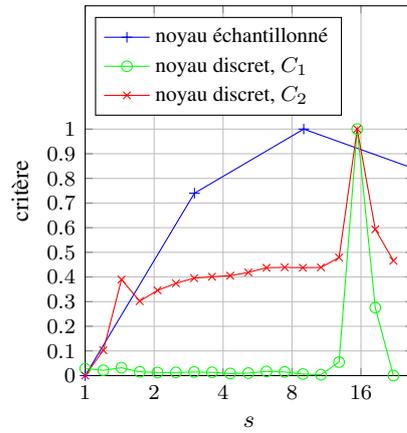
Nous déduisons ainsi de (8), (9) et de l'expression des probabilités impliquées, les valeurs de s^* pour les deux critères.

$$\text{Pour } C_1, s^* = \arg \max_{s \in \mathcal{S}} \frac{|\mathcal{B}_s(f)|}{\mathcal{A}_f} - \frac{|\mathcal{B}_s(\tilde{\varepsilon})|}{\mathcal{A}_{\tilde{\varepsilon}}}; \quad (11)$$

$$\text{pour } C_2, s^* = \arg \max_{s \in \mathcal{S}} \frac{|\mathcal{B}_s(f)|}{|\mathcal{B}_s(\tilde{\varepsilon})|}. \quad (12)$$



(a) Image de synthèse contenant des spots gaussiens de variance 16 px^2



(b) Valeur des critères normalisés entre 0 et 1 en fonction de l'échelle

Figure 4. Comportement des trois critères de sélection d'échelle (normalisés entre 0 et 1) pour la même image qu'à la figure 3, contenant des spots de variance 16 px^2

Dans la figure 4, nous reprenons l'image synthétique de la figure 3 pour présenter le comportement des critères proposés, et les comparer au critère utilisé dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b). Comme nous le voyons sur la figure 4, les deux nouveaux critères permettent de sélectionner une échelle beaucoup plus proche de la variance des spots (avec un rapport d'échelle de 1,2), comparativement au critère proposé dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b). De plus, les critères C_1 et C_2 exhibent un pic beaucoup plus marqué.

Les images que nous traitons sont acquises en microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Avec ce type d'acquisition, nous pouvons postuler que le bruit est composé d'un bruit de grenaille, poissonnien, et d'un bruit électronique, gaussien, c'est-à-dire que l'intensité d'un pixel (x, y) est modélisée de la façon suivante (Starck *et al.*, 1998) :

$$f(x, y) = g_0 N(x, y) + \varepsilon(x, y), \quad (13)$$

où g_0 est le gain du système d'acquisition, $N(x, y)$ le nombre de photons reçus en (x, y) , qui suit une loi de Poisson, et ε représente le bruit blanc gaussien, dont la moyenne et la variance seront respectivement notées μ_ε et σ_ε^2 .

Les critères de sélection d'échelle que nous avons définis supposent un bruit gaussien. Nous pouvons nous ramener à un tel bruit en appliquant une transformée d'Anscombe généralisée \mathcal{T} (Starck *et al.*, 1998) définie par :

$$\mathcal{T}(f(x, y)) = \frac{2}{g_0} \sqrt{g_0 f(x, y) + \frac{3}{8} g_0 + \sigma_\varepsilon^2 - g_0 \mu_\varepsilon}. \quad (14)$$

Les paramètres g_0 , μ_ε , σ_ε^2 sont estimés par une méthode reposant sur des patches proposée dans (Boulinger *et al.*, 2010).

Par ailleurs, si le flux de photons est suffisant, le bruit de Poisson peut être approché par un bruit gaussien et la transformation d'Anscombe évitée, car les critères proposés fonctionnent pour une variance quelconque du bruit gaussien.

3.2. Évaluation des critères

Pour valider la méthode de sélection d'échelle proposée, nous avons effectué des tests sur de nombreuses images synthétiques. Différentes séquences dont le modèle a été défini dans (Smal *et al.*, 2010) ont été générées, contenant des spots gaussiens de différentes variances avec différents rapports signal-sur-bruit (SNR).

Nous avons d'abord comparé les deux critères de sélection d'échelle proposés, associés au filtre gaussien discret, avec celui que nous avons exploité dans (Basset, Boulinger *et al.*, 2014b), associé au filtre gaussien échantillonné. Pour C_1 et C_2 , nous avons utilisé un rapport entre échelles successives de 1,2. Le choix de cette valeur sera motivé plus loin. Les résultats sont rassemblés dans les figures 5 et 6. Dans la figure 5, nous étudions le lien entre variance des spots et échelle sélectionnée, en fixant le SNR à 5, et en faisant varier la taille des spots d'une image à l'autre. Les échelles sélectionnées par C_1 et C_2 sont presque toujours identiques entre elles et proches de la variance des spots. Ainsi, le filtre laplacien de gaussien discret s'adapte précisément à la taille des objets à détecter. Pour augmenter encore la précision, il faudrait diminuer le rapport entre deux échelles consécutives, et donc augmenter le temps de calcul. Avec la méthode précédente cependant, l'échelle du filtre ne pouvait pas s'adapter précisément, car l'ensemble des échelles testées était plus réduit et contraint. Nous verrons dans la section 5 que cela conduit parfois à des erreurs de détection, qui peuvent être évitées grâce à la nouvelle méthode de sélection d'échelle.

Nous avons aussi étudié l'impact du bruit sur la méthode à la figure 6, en fixant la variance des spots à 4 px^2 et en faisant varier le SNR de 1 à 5. Pour des spots de variance assez faible (ici, 4 px^2), le critère C_1 sous-estime l'échelle à SNR faible (SNR < 3), tandis que le critère C_2 la surestime. Comme nous le verrons à la section 5, lorsque le bruit est élevé et les objets à détecter petits, on obtient de meilleurs résultats de détection en utilisant un filtre d'échelle légèrement supérieure à la variance des spots, et on préférera donc utiliser le critère C_2 . Plus précisément, C_2 est un bon compromis entre vrais et faux positifs, tandis que C_1 permet de détecter plus de vrais positifs, au prix de faux positifs supplémentaires. À partir d'un certain SNR (environ 3), les critères sont équivalents, et nous retrouvons une échelle proche de la variance

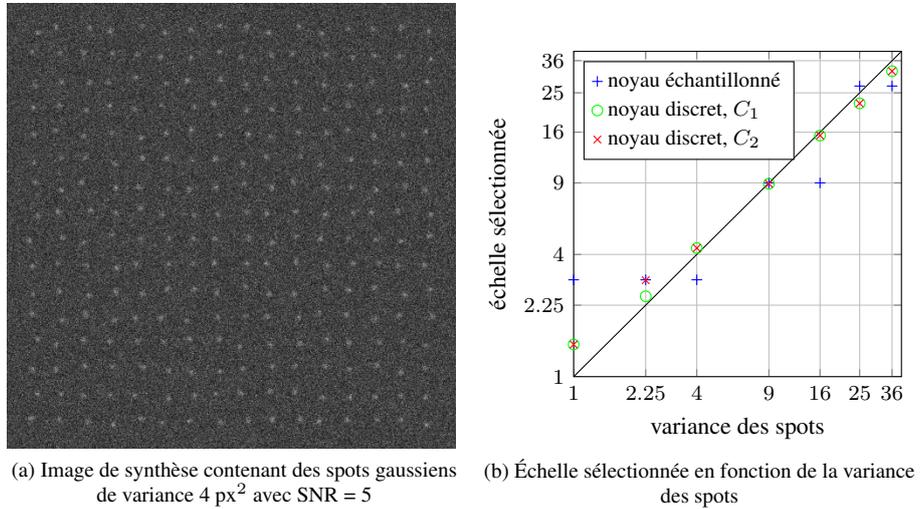


Figure 5. Échelles sélectionnées par les trois critères dans différentes images contenant des spots gaussiens de différentes variances (l'image dont les spots ont une variance de 4 px^2 est présentée à gauche)

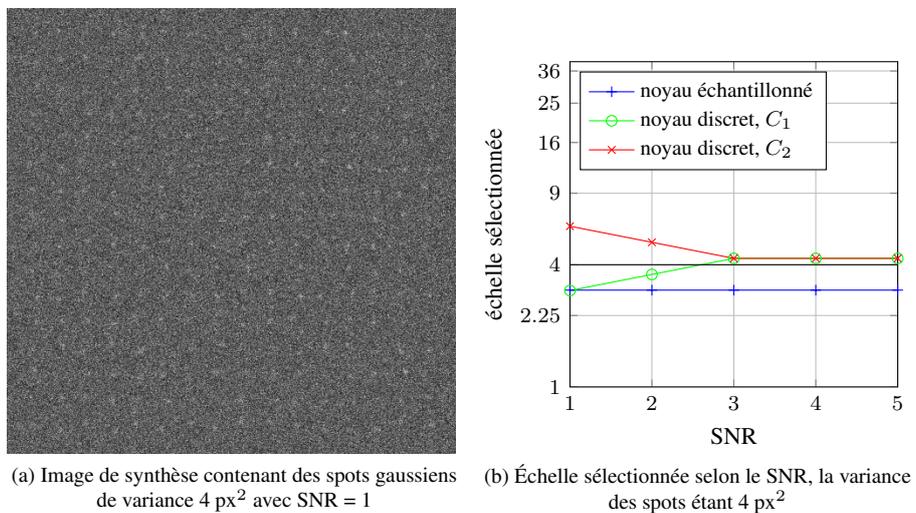


Figure 6. Impact du bruit sur la sélection d'échelle par les trois critères

des spots : $4,30 \text{ px}^2$ est bien l'échelle testée la plus proche de 4 px^2 pour un rapport d'échelle de 1,2. Pour cette étude, nous utiliserons le critère C_2 dans la suite de cet article. Pour d'autres études cependant, on pourra préférer C_1 si une sur-détection n'est pas problématique, par exemple lorsqu'une étape de post-traitement est appliquée à

la détection et réduit le nombre de faux positifs, comme dans (Basset, Bouthemy *et al.*, 2014). Une échelle plus petite permet en effet de mieux discriminer les objets très proches.

Tableau 1. Sensibilité au rapport d'échelle

Variance des spots	Rapport entre échelles successives					
	1,1	1,2	1,5	2	3	3
	Échelle sélectionnée par C_2					par SLT-LoG
1	1,33	1,44	1,5	2	1	3
2,25	2,59	2,99	2,25	2	3	3
4	4,18	4,30	5,06	4	3	3
9	8,95	8,92	7,59	8	9	9
16	15,86	15,41	17,09	16	27	9
25	23,23	22,19	25,63	32	27	27

Par ailleurs, nous avons évalué la sensibilité de la sélection d'échelle au rapport entre échelles successives. Plusieurs rapports ont été testés entre 1 et 3, ce dernier étant le rapport utilisé dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b). Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Comme on peut s'y attendre, diminuer le rapport permet d'améliorer la précision de la sélection d'échelle, qui est bien retrouvée par le critère C_2 . Par ailleurs, soulignons que l'échelle des plus petits spots, de variance 1 px^2 , est retrouvée avec C_2 même pour un rapport égal à 3, alors qu'elle ne l'était pas dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), où le noyau gaussien échantillonné pénalisait les petites échelles (*cf.* figure 2).

Pour montrer plus en détail l'impact du rapport r entre échelles successives, nous avons tracé le critère C_2 , pour différentes valeurs de r , dans la figure 7. Naturellement, le nombre de blobs par échelle décroît en même temps que r , ce qui explique la diminution de la hauteur du pic avec r , d'une part, et l'instabilité pour $r = 1,1$, d'autre part. En effet, pour $r = 1,1$, on observe de nombreux pics, et le maximum est atteint vers 2,5. Ceci est probablement dû au trop grand nombre d'échelles testées par rapport au nombre de blobs dans l'image. Cependant, la même échelle, environ 2, est sélectionnée pour tous les rapports supérieurs à 1,1. Ainsi, le choix du rapport entre échelles successives est un compromis entre précision et fiabilité de la sélection d'échelle. En pratique, nous observons généralement, pour les images traitées, synthétiques et réelles, le même comportement qu'à la figure 7. Nous utilisons donc un rapport $r = 1,2$.

4. Détection de vésicules

Nous avons développé ces nouveaux critères de sélection d'échelle dans l'optique d'améliorer la méthode de détection SLT-LoG (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), qui souffrait d'une relative imprécision du choix de l'échelle, et en particulier d'une prédisposition à surestimer la taille des petits éléments. Pour valider l'approche proposée,

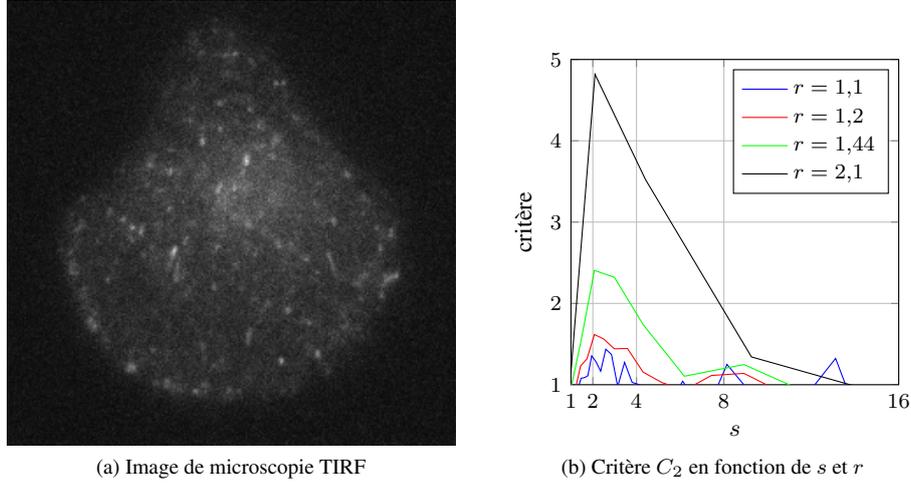


Figure 7. Comportement du critère C_2 dans une image TIRF, en fonction du rapport entre échelles successives. (a) Cellule M10 (la protéine Rab11 est marquée par mCherry) imagée en microscopie TIRF. (b) Critère C_2 pour différents rapports entre échelles successives r .

nous avons remplacé la phase de sélection d'échelle de SLT-LoG par celle décrite en section 3.

Une fois l'échelle s^* sélectionnée, nous nous intéressons à $H_f(s^*)$, c'est-à-dire le laplacien de gaussienne de l'image calculé à l'échelle sélectionnée. La représentation d'un élément fluorescent de f (tel qu'une vésicule) d'échelle s^* dans $H_f(s^*)$ est négative d'amplitude élevée. Ainsi, nous cherchons simplement un seuil τ sous lequel un point de $H_f(s^*)$ est considéré comme appartenant à une vésicule.

Pour des images au contenu complexe, un seuil global ne donne pas de résultats satisfaisants (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b). Il faut donc adapter le seuil à chaque pixel (x, y) de Ω . Nous pouvons supposer que la transformée d'Anscombe de f suit localement une distribution gaussienne. Les opérations (4) et (5) étant des convolutions finies, la distribution de $H_f(s^*)$ est également localement gaussienne. Ainsi, le seuil ponctuel de détection $\tau(x, y)$ se déduit d'une valeur de probabilité de fausse alarme P_{fa} , choisie par l'utilisateur :

$$\tau: \Omega \rightarrow \mathbb{R} \\ (x, y) \mapsto \Phi^{-1}(P_{fa})\sigma(x, y) + \mu(x, y) , \quad (15)$$

où Φ est la fonction de répartition de la loi normale centrée réduite, $\mu(x, y)$ la moyenne locale et $\sigma(x, y)$ l'écart-type local de $H_f(s^*)$, que nous devons donc estimer.

Dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), nous avons proposé deux supports d'estimation de ces grandeurs : une simple fenêtre carrée centrée en (x, y) , ou une fenêtre avec pondération gaussienne des valeurs de $H_f(s^*)$ autour de (x, y) . La fenêtre gaus-

sienne s'avérait plus adaptée et de plus le choix de sa taille n'était alors plus critique. Nous utiliserons donc cette fenêtre pondérée. Pour limiter le temps de calcul, nous utilisons plutôt une approximation récursive du filtre gaussien telle que définie dans (Deriche, 1990) ou (Young, Vliet, 1995). En effet, ces approximations ont les mêmes bonnes caractéristiques que le filtre gaussien, à savoir pas d'effets de blocs comme avec la fenêtre carrée, et une faible sensibilité à la taille de la fenêtre, comme nous le verrons par la suite. Les résultats donnés par le filtre de van Vliet et Young (Young, Vliet, 1995), plus isotrope que celui de Deriche (Deriche, 1990), sont moins robustes dans les zones où le signal est faible ; nous utiliserons plutôt ce dernier.

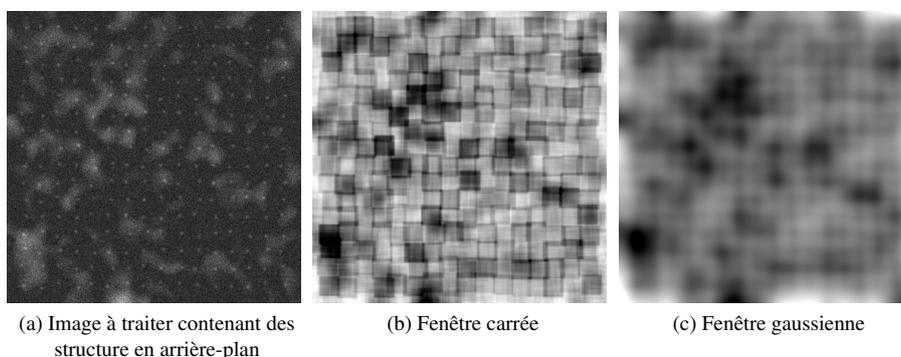


Figure 8. Comparaison des cartes de seuil $\tau(x, y)$ obtenues pour différents types de fenêtres d'estimation locale de la distribution de $H_f(s^*)$

Des exemples de cartes de seuil $\tau(x, y)$ sont donnés à la figure 8. Les artefacts très prononcés liés à la fenêtre carrée disparaissent avec la pondération gaussienne. On retrouve les structures d'arrière plan inversées dans la carte de seuils, car le laplacien de gaussienne est un opérateur négatif. Ainsi, dans les zones où le contraste est élevé, seuls les pixels très brillants de f (*i.e.* très sombres dans $H_f(s^*)$) sont détectés.

Dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014a), nous avons proposé une fenêtre creuse (c.f. figure 9), qui donnait des résultats légèrement meilleurs sur les images issues de (Smal *et al.*, 2010) que la fenêtre gaussienne. Cependant, nous introduisons dans la section suivante un nouveau banc de test constitué d'images plus complexes comprenant des objets plus petits, et sur lequel les résultats sont largement meilleurs avec la fenêtre gaussienne. Ce dernier jeu de données étant plus réaliste, nous préférons retenir la fenêtre gaussienne. De même, dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014a), une étape de post-traitement consistant à supprimer les plus petites détections améliorait un peu les résultats. Sur notre nouveau banc de test d'images, au contraire, nous constatons une dégradation des performances.

La fenêtre creuse et le post-traitement améliorent le taux de bonnes détections de quelques millièmes sur le banc de test de (Smal *et al.*, 2010), et le dégradent de plusieurs centièmes, voire dixièmes, sur notre nouveau banc de test. Par conséquent,

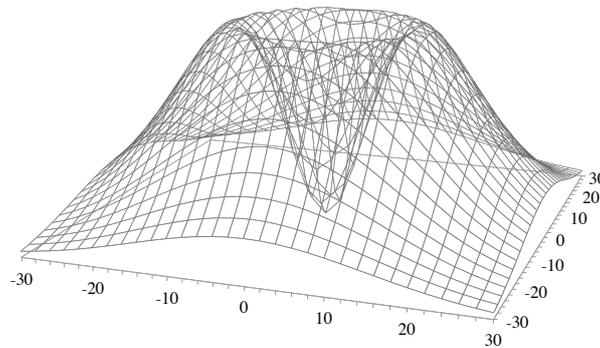


Figure 9. Allure de la fenêtre creuse d'estimation

nous utilisons la fenêtre gaussienne et ne réalisons plus ce post-traitement, ce qui offre également l'avantage de simplifier la méthode et de diminuer le temps de calcul.

Comme nous le verrons dans la prochaine section, la taille de la fenêtre a peu d'impact sur les performances de la détection et ne constitue pas un paramètre critique. La probabilité de fausse alarme, quant à elle, agit sur la sensibilité de détection, qui doit être réglée en fonction de l'application : une valeur faible permettra d'avoir une grande confiance dans les détections, tandis qu'une valeur élevée sera plus appropriée si d'autres considérations (modèle biologique, cohérence spatiotemporelle...) permettent d'éliminer ultérieurement les fausses détections résultantes. De plus, comme ce paramètre est indépendant de la dynamique de l'image, sa valeur peut être choisie pour tout un jeu de données, alors qu'un seuil sur les intensités ou leur gradient est sensible à la dynamique des images, qui peut même évoluer au fil d'une séquence.

5. Résultats expérimentaux

5.1. Résultats sur les images du Synthetic Data Generator

Afin de comparer les performances de notre méthode de détection pour les différents critères de sélection d'échelle, nous l'avons appliquée aux images synthétiques générées par le plugin ImageJ *Synthetic Data Generator* introduit dans (Smal *et al.*, 2010). Il s'agit de séquences de 16 images de taille 512×512 , contenant une grille de 4096 spots gaussiens isotropes (dits ronds) ou anisotropes (dits allongés). Trois types de fond d'image peuvent être inclus : (A) valeur constante, (B) dégradé horizontal, (C) insertion de larges structures. Un bruit de Poisson est ensuite ajouté. Afin de comparer les résultats de notre méthode à ceux fournis dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b ;

Rezatofighi *et al.*, 2012 ; Smal *et al.*, 2010), nous prenons la même valeur de SNR, soit 2. Des exemples de telles images sont montrés à la figure 10.

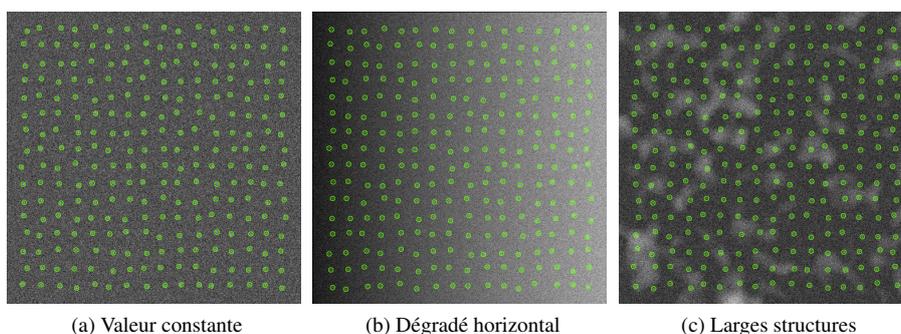


Figure 10. Images du banc d'essai Synthetic Data Generator (les spots sont repérés en vert pour plus de lisibilité)

Nous reprenons les notations de (Smal *et al.*, 2010) : TP représente le nombre de vraies détections, FN le nombre de spots non détectés, et FP le nombre de fausses détections. Dans (Smal *et al.*, 2010), les différentes méthodes sont évaluées selon le taux de vrais positifs (ou rappel) $TPR = TP/(TP+FN)$, et le taux relatif de faux positifs $FPR^* = FP/(TP+FN)$. Pour des besoins de comparaison, nous conservons ces deux mesures.

Les paramètres des méthodes auxquelles nous nous comparons ont été ajustés pour chaque séquence, de façon à obtenir le meilleur score possible. Pour plus de détails, nous renvoyons le lecteur à (Smal *et al.*, 2010) et (Rezatofighi *et al.*, 2012).

Afin de démontrer la faible sensibilité des paramètres de notre méthode, nous avons choisi de les fixer une fois pour toutes pour traiter l'ensemble des séquences du banc de test. Ainsi, nous utilisons l'espace des échelles $\mathcal{S} = \{1; 1,2; 1,44; \dots; 38,33\}$ correspondant à un rapport d'échelle de 1,2 sur une dynamique allant de 1 à 40 px^2 , et une fenêtre d'estimation des statistiques locales d'un rayon de 15 px, c'est-à-dire à peu près la taille des structures dans les images de type C. En utilisant ce rapport d'échelle de 1,2, nous pouvons nous contenter, pour économiser le temps de calcul, de sélectionner l'échelle optimale sur une seule image 512×512 par séquence. En pratique, l'échelle sélectionnée est la même que si nous utilisions les 16 images. Ainsi, nous faisons varier un seul paramètre, la probabilité de fausse alarme P_{fa} , afin d'atteindre, comme dans (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b ; Rezatofighi *et al.*, 2012 ; Smal *et al.*, 2010), un FPR^* de 0,01 à chaque fois.

Nous avons évalué le temps d'exécution sur un ordinateur portable équipé de quatre cœurs cadencés à 2,3 GHz. Pour la première image, le temps de calcul de la phase de sélection d'échelle est de l'ordre de 2 s. Une fois l'échelle sélectionnée, la détection prend environ 0,15 s par image. Ces temps de calcul sont proportionnels à la taille des images.

Tableau 2. Comparaison avec les méthodes de l'état de l'art à SNR = 2

Type d'objet		Rond			Allongé		
Type d'arrière-plan		A	B	C	A	B	C
Méthode		TPR pour FPR* = 0.01					
TH	(Bright, Steel, 1987)	0,99	0,88	0,48	0,99	0,96	0,56
HD	(Vincent, 1993)	0,99	0,97	0,90	0,99	0,99	0,97
WMP	(Olivo-Marin, 2002)	0,81	0,37	0,30	0,31	0,17	0,18
IFD1	(Haar Romeny, 2003)	0,98	0,67	0,89	0,53	0,31	0,31
IFD2	(Haar Romeny, 2003)	0,99	0,46	0,71	0,59	0,23	0,19
MTH	(Soille, 2003)	0,99	0,87	0,88	0,99	0,98	0,91
SEF	(Sage <i>et al.</i> , 2005)	0,99	0,91	0,95	0,99	0,99	0,95
MS-VST	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	0,99	0,99	0,93	0,99	0,99	0,96
MPHD	(Rezatofighi <i>et al.</i> , 2012)	0,99	0,97	0,94	0,99	0,99	0,95
SLT-LoG	(2014)	1,00	0,99	0,98	1,00	1,00	1,00
Méthode proposée		1,00	1,00	0,99	1	1	1,00

Le tableau 2 montre que les performances de notre nouvelle approche surpassent à la fois la précédente méthode SLT-LoG (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b), et les huit autres méthodes de détection citées dans l'introduction et évaluées dans (Rezatofighi *et al.*, 2012 ; Smal *et al.*, 2010). Nous reprenons les scores donnés dans ces deux articles pour les 9 autres méthodes. La valeur 1,00 est un arrondi du TPR à deux décimales, tandis que la valeur 1 signifie que *tous* les objets ont été détectés et que le FPR* est inférieur à 0,01. Pour toutes les séquences, notre méthode donne de meilleurs résultats que les méthodes évaluées dans (Smal *et al.*, 2010 ; Rezatofighi *et al.*, 2012).

5.2. Évaluation comparative sur le banc de test réaliste Spot in M10

Comme nous venons de le voir, les meilleures méthodes de détection fournissent de très bons résultats sur le banc de test simple introduit dans (Smal *et al.*, 2010). Nous proposons donc un nouveau jeu d'images plus complexes et réalistes pour comparer les meilleurs détecteurs dans des situations plus représentatives. Pour construire les images, nous avons extrait l'arrière-plan d'images TIRF réelles de cellules M10, à l'aide d'un algorithme de « rolling-ball », puis avons ajouté aléatoirement à cet arrière-plan des spots gaussiens. Ainsi, nous désignons par *Spot in M10* ce nouveau jeu de données. Enfin, les images ont été corrompues par un bruit poissonien-gaussien tel que défini en (13).

Dans l'optique de construire un banc de test plus réaliste et plus complexe, nous avons choisi de générer des objets de petite taille. En effet, les images de microscopie contiennent souvent des objets plus petits que dans les images de (Smal *et al.*, 2010). De plus, nous avons vu que les résultats des différentes méthodes sont extrêmement bons et semblables pour le banc de test précédent. Utiliser de plus petits objets et un bruit élevé permet de comparer le comportement des méthodes dans des cas plus

critiques. Nous avons ainsi créé six collections d'images, en faisant varier la variance des spots entre 1 et $1,44 \text{ px}^2$ et le rapport signal-sur-bruit de crête (PSNR) entre 18 et 30 dB. Chaque collection est constituée de 100 images comprenant chacune 45 à 80 spots. Une image de chaque collection est fournie à la figure 11. Ce banc de test est mis à disposition publique ¹.

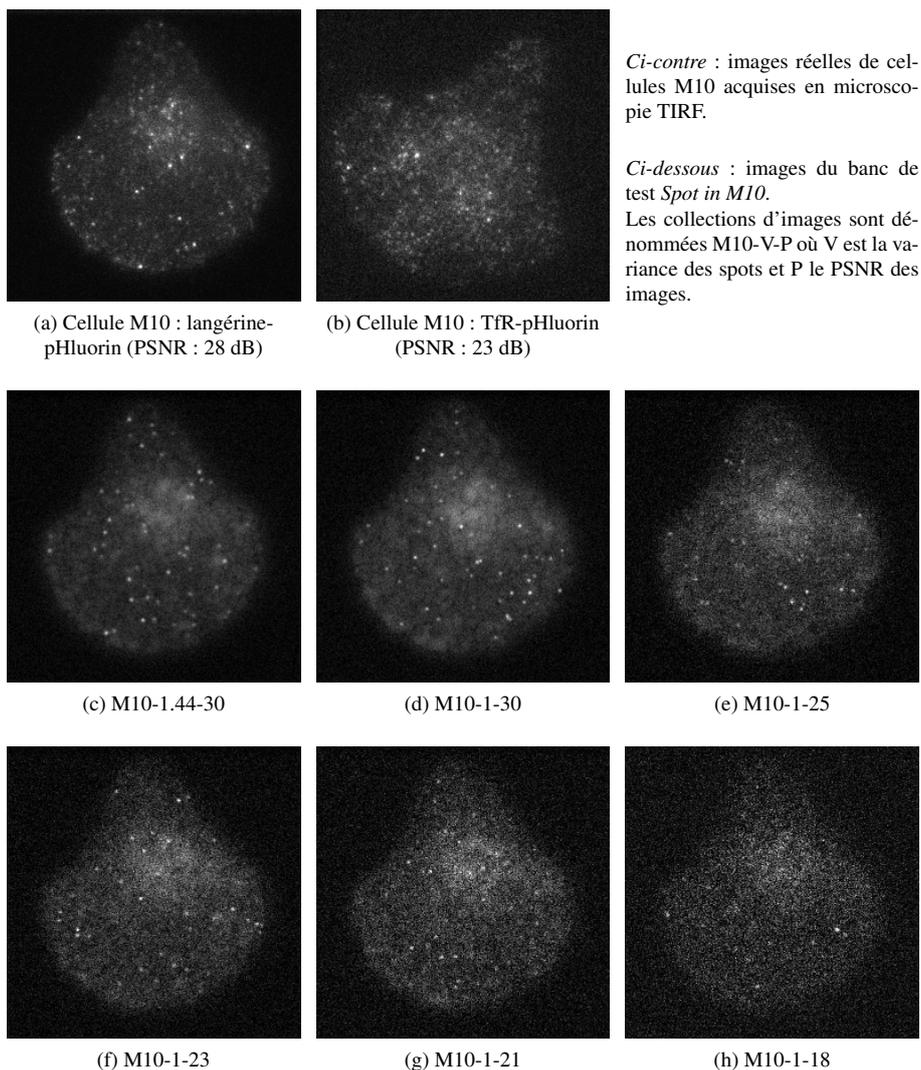


Figure 11. Images du banc de test *Spot in M10*

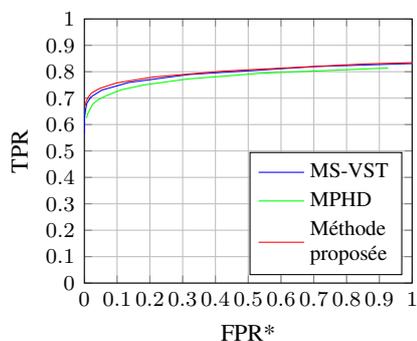
1. <https://serpico.rennes.inria.fr/doku.php?id=data:index>

Nous avons comparé les performances de notre méthode aux méthodes les mieux classées sur le banc de test précédent, à savoir MS-VST et MPHD. Les résultats pour chaque collection d'images sont présentés sous forme de courbes TPR-FPR* à la figure 12. Pour évaluer les méthodes MS-VST et MPHD, nous avons utilisé les codes disponibles sur les sites des auteurs respectifs. Généralement, MS-VST donne de meilleurs résultats que MPHD à faible niveau de bruit, tandis que le contraire vaut à niveau de bruit élevé. Notre méthode est très proche de MS-VST à PSNR élevé, mais se comporte mieux quand le niveau de bruit augmente. Ainsi, nos résultats sont presque toujours supérieurs à la fois à ceux de MS-VST et à ceux de MPHD. En plus des valeurs de TPR, nous introduisons d'autres mesures de performance. L'aire sous la courbe TPR-FPR* permet d'appréhender le comportement moyen des méthodes en faisant varier le seuil de détection, tandis que le meilleur F-score atteignable donne une mesure de performance optimale. Comme nous le voyons dans le tableau 3, quelle que soit la mesure de performance considérée, notre méthode est toujours classée première sauf dans un cas (M10-1-21) où MPHD est légèrement meilleur autour de $FPR^* = 0,01$.

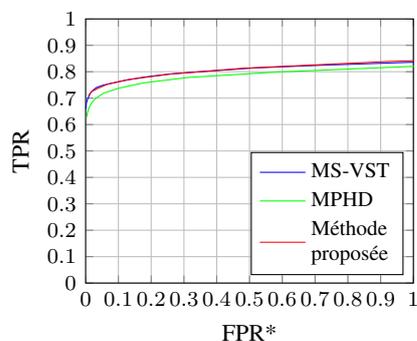
Tableau 3. Comparaison avec MS-VST et MPHD sur le banc de test Spot in M10

Variance des spots	1,44	1	1	1	1	1
PSNR	30	30	25	23	21	18
TPR à $FPR^* = 0,01$						
MS-VST	0,69	0,71	0,46	0,40	0,29	0,13
MPHD	0,64	0,66	0,50	0,44	0,35	0,18
Méthode proposée	0,70	0,71	0,50	0,45	0,34	0,18
Aire sous la courbe TPR-FPR*						
MS-VST	0,79	0,80	0,65	0,60	0,52	0,36
MPHD	0,77	0,78	0,66	0,61	0,53	0,39
Méthode proposée	0,80	0,80	0,69	0,64	0,55	0,44
F-score maximal						
MS-VST	0,82	0,83	0,68	0,64	0,56	0,41
MPHD	0,80	0,81	0,70	0,66	0,58	0,44
Méthode proposée	0,83	0,83	0,71	0,67	0,58	0,48

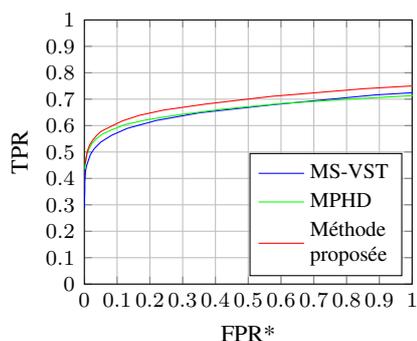
Sur ce nouveau jeu de données, nous nous sommes également intéressés à la sensibilité des paramètres des trois méthodes évaluées. Pour MS-VST et notre méthode, nous avons pu garder les mêmes valeurs de paramètres pour toutes les séquences. Les échelles 2 et 3 ont été utilisées pour MS-VST, et pour notre méthode, l'écart-type de la fenêtre gaussienne d'estimation des statistiques locales a été fixé à 60 px, ce qui correspond à l'ordre de grandeur du rayon des structures d'arrière-plan. De plus, comme nous le verrons dans la prochaine sous-section, ce paramètre n'est pas du tout critique. Pour obtenir les meilleurs résultats possibles avec MPHD, nous avons dû faire varier l'échelle du laplacien de gaussienne entre $0,69 \text{ px}^2$ pour les images les moins bruitées et 1 px^2 pour les plus bruitées. Cependant, les résultats de MPHD ne sont pas modifiés en faisant varier la taille maximale des dômes entre 5 et 20 px.



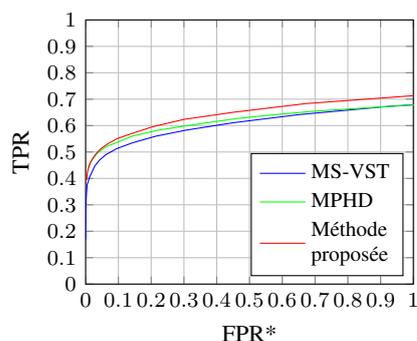
(a) Variance des spots : 1,44 ; PSNR : 30 dB



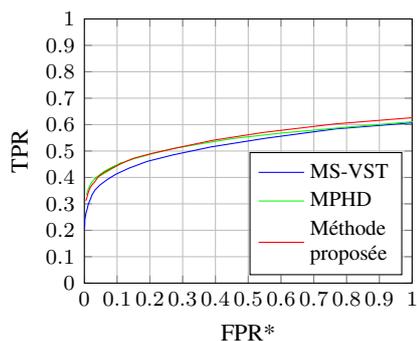
(b) Variance des spots : 1 ; PSNR : 30 dB



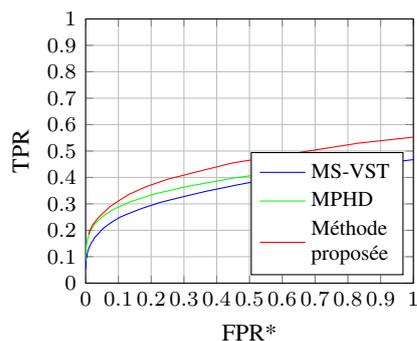
(c) Variance des spots : 1 ; PSNR : 25 dB



(d) Variance des spots : 1 ; PSNR : 23 dB



(e) Variance des spots : 1 ; PSNR : 21 dB



(f) Variance des spots : 1 ; PSNR : 18 dB

Figure 12. Comparaison de notre méthode à MS-VST et MPHD sur le banc de test Spot in M10

5.3. Influence de la taille de la fenêtre et de la sélection d'échelle

Dans la figure 13, les courbes TPR-FPR* obtenues avec des fenêtres d'écart type 40 à 80 px sont quasiment indiscernables, ce qui démontre la très faible sensibilité de la méthode à ce paramètre, qui est le seul à fixer en pratique, en dehors de la PFA.

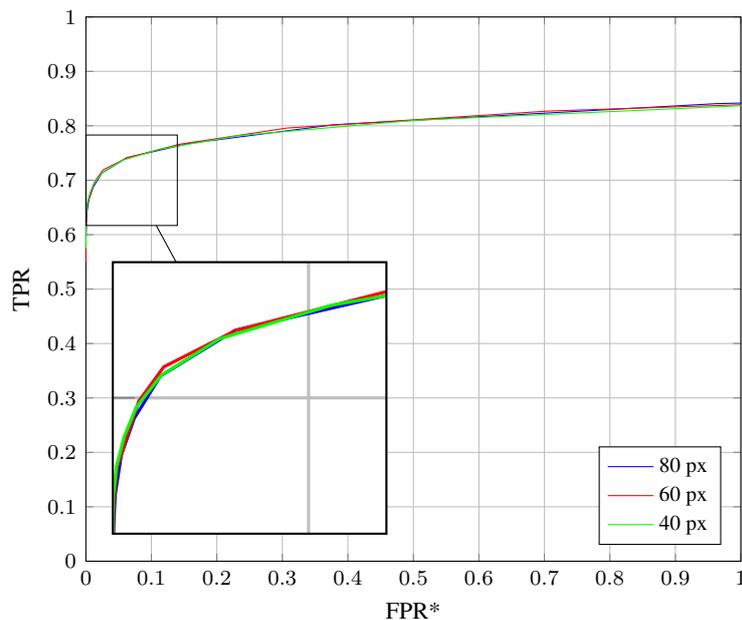


Figure 13. Sensibilité à la taille de la fenêtre gaussienne d'estimation illustrée sur l'ensemble d'images M10-1-30

Enfin, nous avons évalué la pertinence de l'échelle sélectionnée automatiquement par notre méthode. Dans la collection d'images M10-1-30, les spots ont une variance de 1 px^2 . On peut donc s'attendre à ce que les meilleurs résultats de détection soient obtenus avec $s^* = 1$. Cependant, une échelle sensiblement plus grande (1,44) a été sélectionnée par le critère C_2 . Pour vérifier la pertinence de cette échelle, nous avons appliqué le laplacien de gaussienne pour différentes valeurs, à savoir 1, 1,2, 1,44, 1,73, 2. Nous avons évalué les performances de détection pour chaque échelle testée. Les résultats sont présentés à la figure 14. Les meilleurs résultats sont bien obtenus avec une échelle de 1,44, ce qui démontre l'efficacité de la phase de sélection d'échelle. Comme nous l'avions évoqué précédemment, il vaut parfois mieux surestimer l'échelle en raison du bruit. Notre méthode de sélection automatique d'échelle permet donc de trouver la meilleure échelle de détection, qui n'est pas toujours la variance vraie des spots.

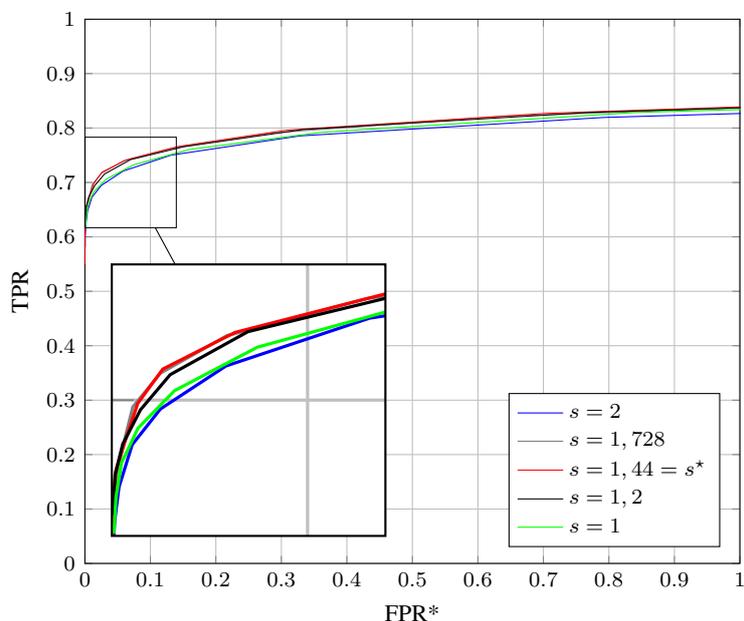


Figure 14. Précision de la sélection d'échelle illustrée sur l'ensemble d'images M10-1-30

5.4. Résultats sur séquences réelles

Nous avons également mené des expériences sur des images réelles de microscopie de fluorescence. Des cellules M10, exprimant diverses protéines, ont été imagées en microscopie TIRF. Des séquences de 300 images ont été acquises à raison de 10 images par seconde. Les images, de taille 256 x 256 à 512 x 512 px, sont codées sur 16 bits.

Dans les images de la figure 15, la GTPase Rab11 et la protéine transmembranaire langérine ont été marquées respectivement par mCherry et pHluorin. Un dispositif optique, appelé Dual View, permet de séparer les longueurs d'ondes d'émission respectives de ces deux marqueurs (Gidon *et al.*, 2012). Ainsi, on observe côte-à-côte Rab11 (à gauche) et langérine (à droite). Ceci produit des dynamiques d'intensité très différentes dans les deux moitiés de l'image. Malgré cela, notre seuillage adaptatif permet de détecter les vésicules dans les deux canaux. En fait, certaines vésicules détectées dans la partie droite ont même une amplitude plus faible que les variations d'arrière-plan de la partie gauche.

Nous avons comparé les résultats de détection de notre méthode avec MS-VST, sur des images complexes comportant des spots très allongés, comme l'illustre la figure 16. Contrairement à MS-VST, MPHD ne fournit pas de carte binaire de détection (seulement une liste de coordonnées correspondant aux maxima locaux), c'est pour-

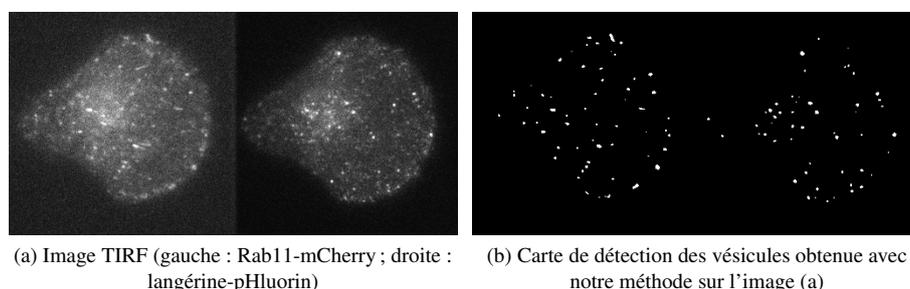


Figure 15. Résultats de détection par notre méthode sur une image Dual View

quo nous nous contentons d'une comparaison avec MS-VST. Une séquence TIRF, dont deux images sont présentées à la figure 16, où la GTPase Rab11 a été marquée par mCherry, a été traitée avec les deux méthodes. Nous avons réglé la PFA de notre méthode et le seuil de détection de MS-VST de façon à obtenir des résultats les plus proches possibles avec les deux méthodes, et donc à peu près le même nombre de détections dans toute la séquence, soit 24 195 et 24 481 objets, respectivement. Beaucoup plus d'objets allongés sont mal détectés par MS-VST que par notre méthode (repérés en rouge). En fait, l'échelle de l'ondelette utilisée par MS-VST est trop petite par rapport aux spots, et ne peut pas être adaptée plus précisément, alors que notre sélection d'échelle s'adapte plus finement aux données. Par conséquent, un spot allongé dans l'image conduit plus facilement à deux composantes connexes dans la carte de détection produite par MS-VST que notre méthode.

6. Conclusion

Nous avons proposé une nouvelle méthode de détection de vésicules dans des séquences de microscopie TIRF. Le recours au filtre gaussien discret, et l'utilisation de deux nouveaux critères de sélection d'échelle de précision arbitraire permettent d'améliorer grandement les performances de détection par rapport à (Basset, Boulanger *et al.*, 2014b). Nos résultats surpassent également ceux des méthodes existantes sur toutes les séquences présentées dans (Smal *et al.*, 2010). Par ailleurs, nous avons proposé un nouveau banc de test plus difficile et plus réaliste pour évaluer et comparer les méthodes de détection de spots. Sur ces images, nous avons comparé notre méthode aux méthodes les mieux classées sur le banc de test de (Smal *et al.*, 2010). Dans quasiment tous les cas, notre méthode montre de meilleures performances que MS-VST et MPH. Sur les séquences réelles traitées, grâce à une échelle plus finement réglée, la détection des vésicules est d'une meilleure précision que la méthode MS-VST, déjà très performante. En particulier, notre méthode parvient à mieux détecter les objets allongés, et donne une carte de détection plus précise.

Enfin, cette nouvelle méthode ne demande quasiment pas de paramétrage, de sorte que les mêmes réglages peuvent être utilisés pour traiter toutes les images d'un jeu de

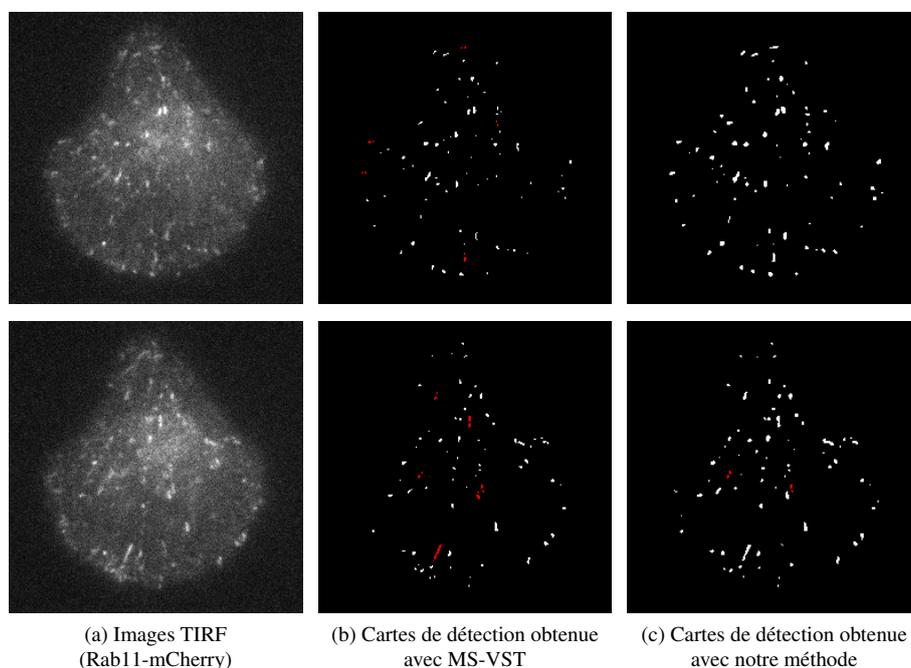


Figure 16. Comparaison des cartes de détection obtenues avec MS-VST et notre méthode, sur une séquence d'images TIRF (haut : 93^{ème} image ; bas : 300^{ème} image de la séquence). Les objets allongés mal détectés sont repérés en rouge.

données. Elle est donc facilement utilisable par un biologiste, qui n'aura à fixer que la probabilité de fausse alarme. Ceci lui permettra d'adapter la méthode aux caractéristiques des images traitées ou de spécifier sa performance en fonction des applications visées. Au-delà de la microscopie optique, notre méthode de détection de spots devrait pouvoir être appliquée à des images d'autres domaines présentant des caractéristiques similaires.

Bibliographie

- Axelrod D. (2008). Total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods in Cell Biology*, vol. 89, p. 169–221.
- Basset A., Boulanger J., Bouthemy P., Kervrann C., Salamero J. (2014a, juillet). Sélection d'échelle automatique précise et seuillage localement adapté pour la segmentation de vésicules en microscopie TIRF. In *Congrès de sur la Reconnaissance des Formes et d'Intelligence Artificielle*. Rouen.
- Basset A., Boulanger J., Bouthemy P., Kervrann C., Salamero J. (2014b, avril). SLT-LoG: A vesicle segmentation method with automatic scale selection and local thresholding applied to TIRF microscopy. In *IEEE Int. Symp. Biomedical Imaging*. Pékin.

- Basset A., Boutheymy P., Boulanger J., Salamero J., Kervrann C. (2014, avril). Detection and classification of dynamic subcellular events in TIRF microscopy sequences. In *IEEE Int. Symp. Biomedical Imaging*. Pékin.
- Boulanger J., Kervrann C., Boutheymy P., Elbau P., Sibarita J.-B., Salamero J. (2010, fév.). Patch-based non-local functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE Trans. Medical Imaging*, vol. 29, n° 2, p. 442–453.
- Bright D., Steel E. (1987, mai). Two-dimensional top hat filter for extracting spots and spheres from digital images. *J. Microscopy*, vol. 146, n° 2, p. 191–200.
- Deriche R. (1990, jan.). Fast algorithms for low-level vision. *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 12, n° 1, p. 78–87.
- Gidon A., Bardin S., Cinquin B., Boulanger J., Waharte F., Heliot L. *et al.* (2012, juin). A Rab11A/myosin Vb/Rab11-FIP2 complex frames two late recycling steps of langerin from the ERC to the plasma membrane. *Traffic*, vol. 13, n° 6, p. 815–833.
- Haar Romeny B. ter. (2003). *Front-end vision and multi-scale image analysis*. Springer.
- Lindeberg T. (1993). *Scale-space theory in computer vision*. Springer.
- Meijering E., Dzyubachyk O., Smal I. (2012). *Methods for cell and particle tracking*. Elsevier.
- Olivo-Marin J.-C. (2002, sept.). Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recognition*, vol. 35, n° 9, p. 1989–1996.
- Rezatofghi S., Hartley R., Hughes W. (2012, mai). A new approach for spot detection in total internal reflection fluorescence microscopy. In *IEEE Int. Symp. Biomedical Imaging*. Barcelone.
- Sage D., Neumann F., Hediger F., Gasser S., Unser M. (2005, sep.). Automatic tracking of individual fluorescence particles: Application to the study of chromosome dynamics. *IEEE Trans. Image Processing*, vol. 14, n° 9, p. 1372–1383.
- Smal I., Loog M., Niessen W., Meijering E. (2010, fév.). Quantitative comparison of spot detection methods in fluorescence microscopy. *IEEE Trans. Medical Imaging*, vol. 29, n° 2, p. 282–301.
- Soille P. (2003). *Morphological image analysis: Principles and applications*. Springer.
- Starck J.-L., Murtagh F. D., Bijaoui A. (1998). *Image processing and data analysis: The multiscale approach*. Cambridge University Press.
- Vincent L. (1993, avril). Morphological grayscale reconstruction in image analysis: Applications and efficient algorithms. *IEEE Trans. Image Processing*, vol. 2, n° 2, p. 176–201.
- Young I., Vliet L. van. (1995, juin). Recursive implementation of the Gaussian filter. *Signal Processing*, vol. 44, n° 2, p. 139–151.
- Zhang B., Fadili M., Starck J.-L., Olivo-Marin J.-C. (2007, oct.). Multiscale variance-stabilizing transform for mixed-Poisson-Gaussian processes and its applications in bioimaging. In *IEEE Int. Conf. Image Processing*. San Antonio.

Article soumis le 11/12/2014

Accepté le 23/06/2015