

# Applications en Bio-imagerie

Alice OTHMANI, PhD  
Maître de conférences à l'UPEC  
Email: [alice.othmani@u-pec.fr](mailto:alice.othmani@u-pec.fr)

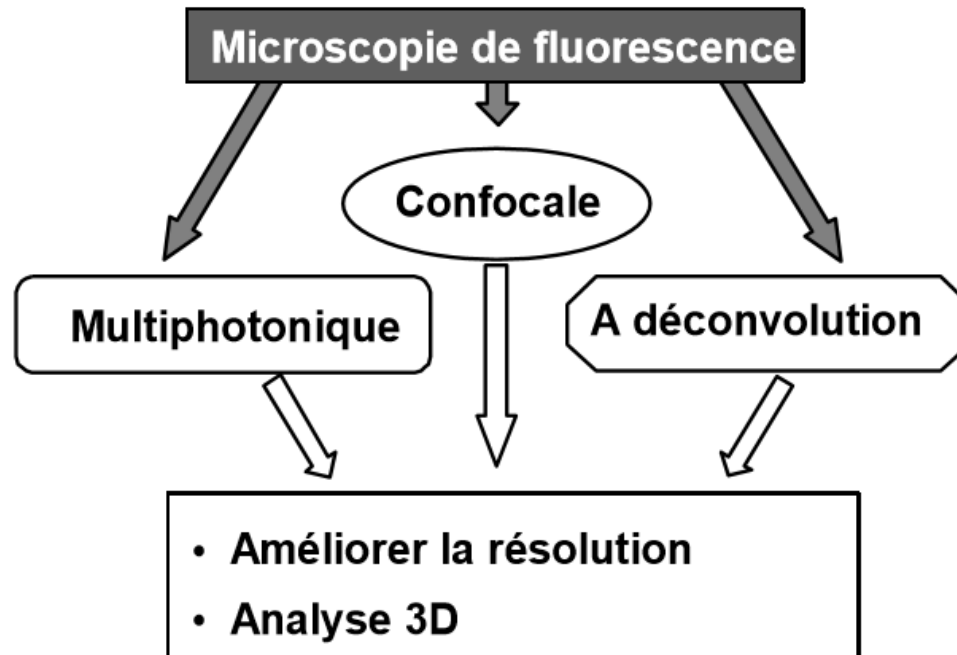
# Microscopie de fluorescence

Le microscope à fluorescence permet de détecter la présence et la localisation de molécules fluorescentes dans un échantillon.



Un microscope confocal utilisé pour localiser des macromolécules.  
(H. Raguet, Photothèque CNRS)

# Microscopie de Fluorescence



Un objectif commun: améliorer la résolution du microscope photonique et permettre une analyse tridimensionnelle des objets biologiques.

## Microscopie de fluorescence

Le microscope confocal est une variante permettant de détecter et de réaliser **des images de l'échantillon à trois dimensions avec une bonne résolution.**

## Microscopie de fluorescence

- Dans ces microscopes, l'échantillon contient des **molécules fluorescentes**.
- Celles-ci sont **excitées** par un **faisceau lumineux** et leur fluorescence est alors détectée.
- Dans le microscope confocal, **l'excitation** est focalisée en un point précis de l'échantillon puis balayée dans tout le volume, permettant ainsi la reconstruction d'une image à trois dimensions.

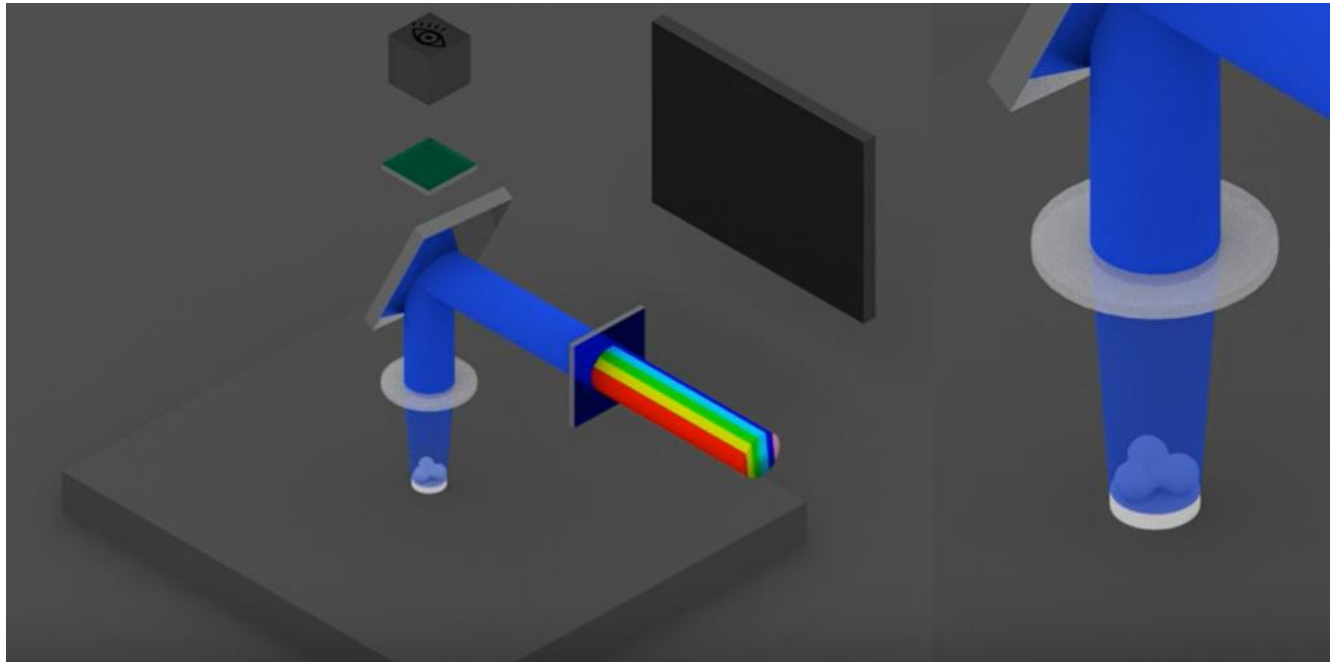
## Microscope à fluorescence

- Un microscope à fluorescence est simplement un **microscope optique** utilisant des **échantillons fluorescents**.
- Il est composé de **lentilles** pour grossir l'objet, d'un **miroir dichroïque** et de **filtres**

## Microscope à fluorescence

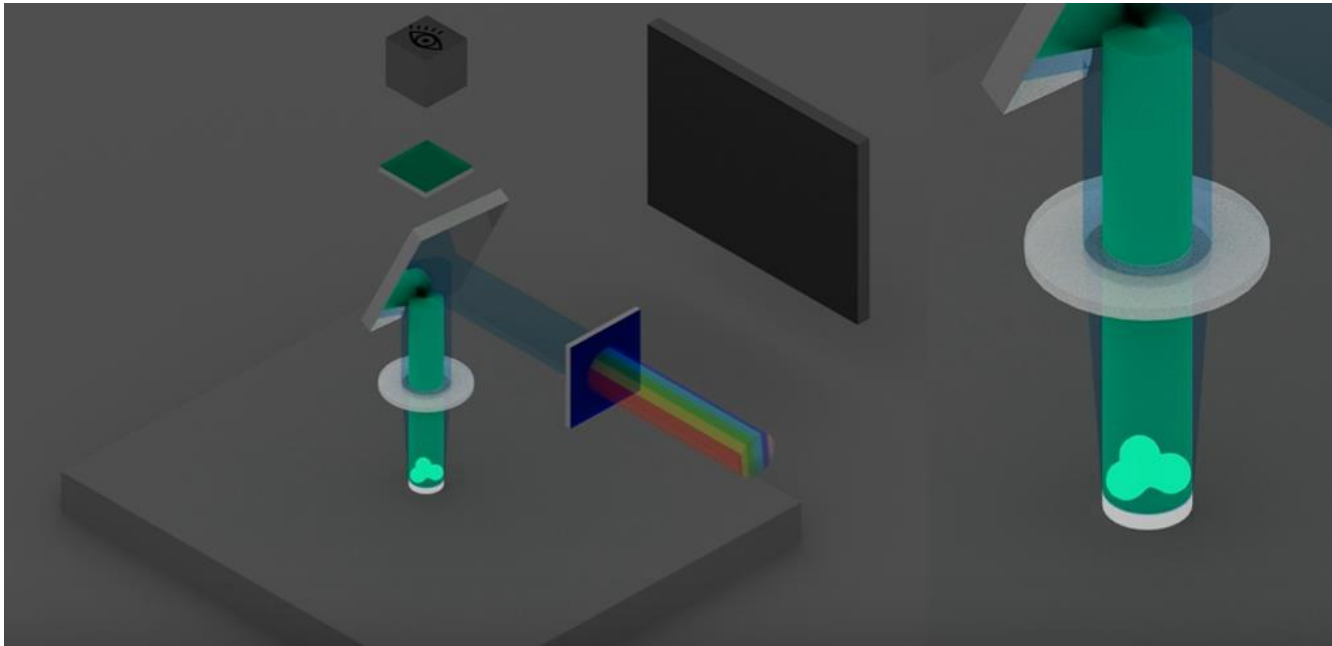
Le premier filtre sélectionne la couleur qui va exciter les fluorochromes de l'échantillon (ici le bleu).

Cette lumière bleue illumine une large région de l'échantillon.



## Microscope à fluorescence

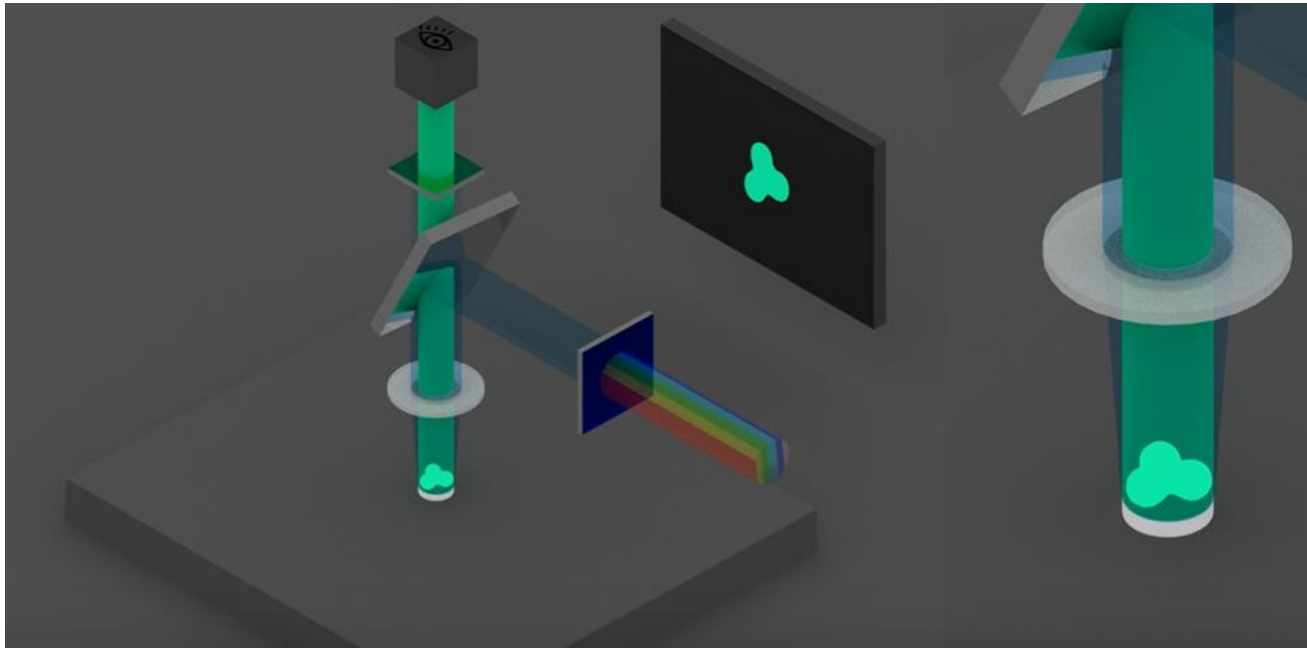
Quand les fluorophores sont illuminés avec la bonne longueur d'onde (ici dans le **bleu**), ces fluorophores émettent par fluorescence de la lumière avec une autre longueur d'onde (ici dans le **vert**).





## Microscopie de fluorescence

- Le miroir dichroïques et le deuxième filtre permettent de sélectionner seulement la lumière émise par l'échantillon.
- On détecte alors l'image de la partie fluorescente de l'échantillon.



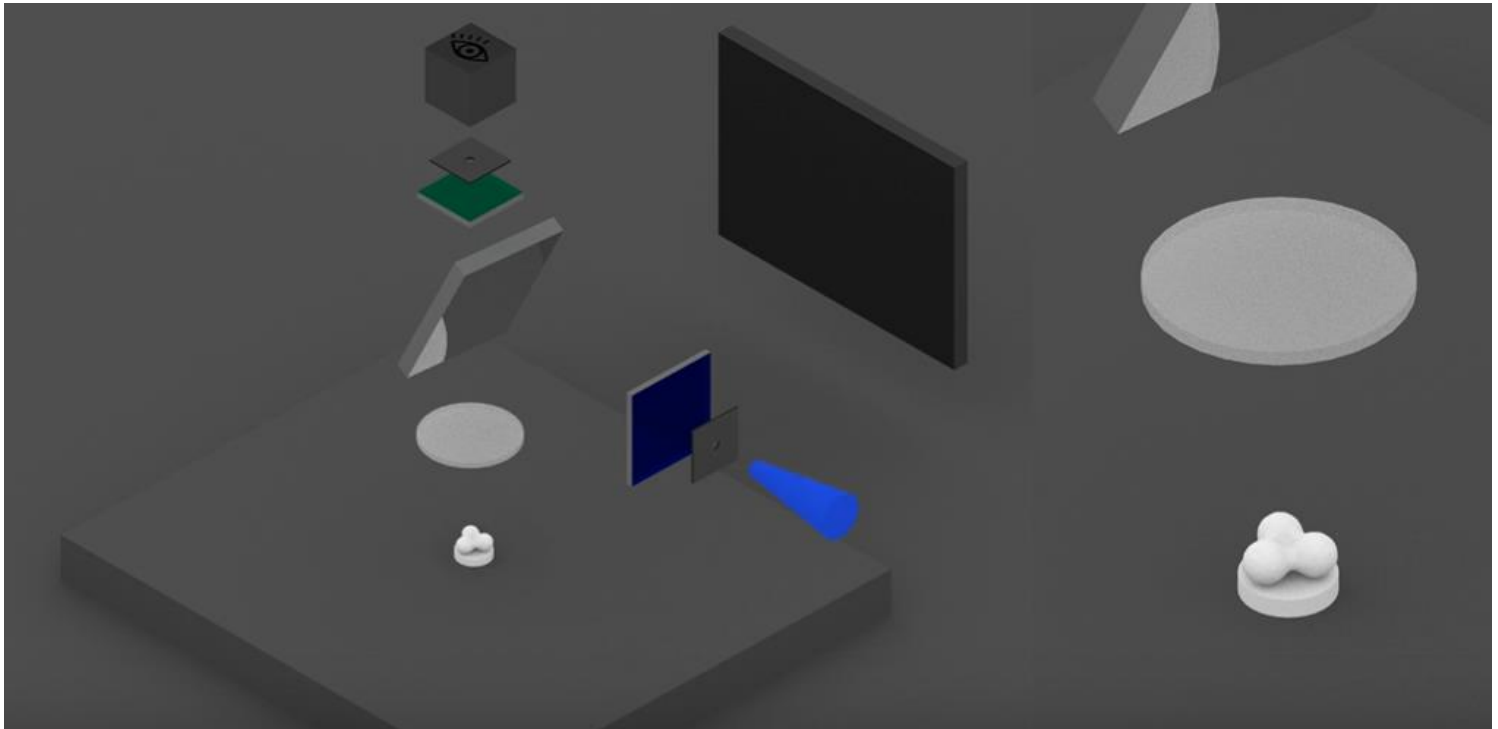
## Microscopie de fluorescence

Ces microscopes permettent de détecter la présence et la localisation d'un très petit nombre de molécules dans un échantillon biologique.

## Microscope Confocal

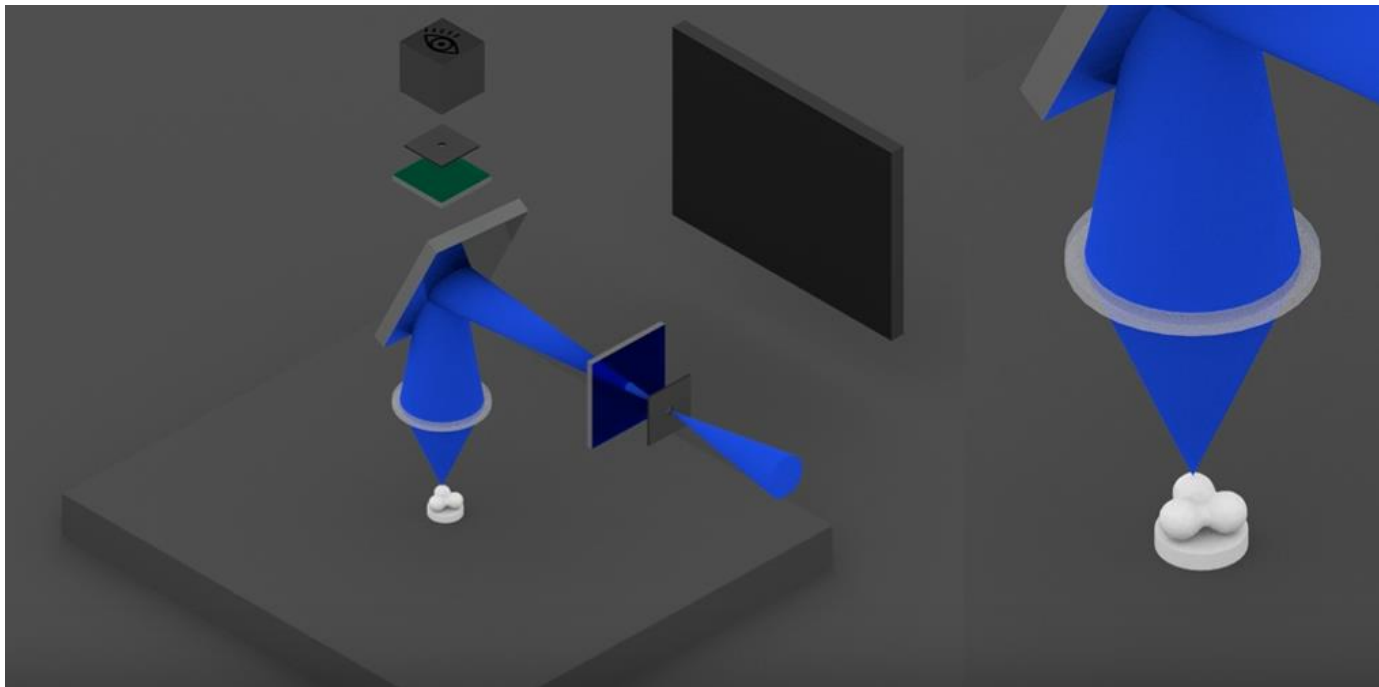
Le microscope confocal est une variante du microscope à fluorescence.

Deux diaphragmes (les petits trous) sont placés dans le trajet de la lumière.



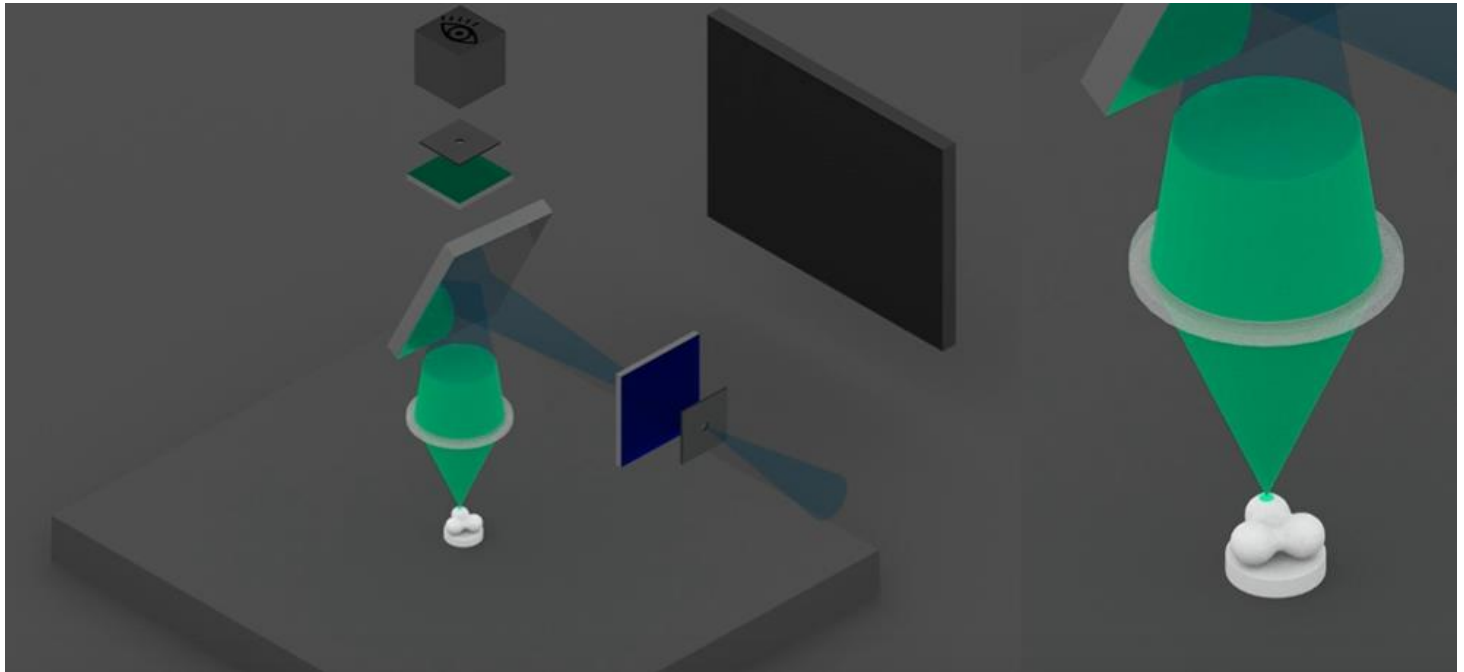
# Microscope Confocal

Le faisceau est focalisé seulement sur une petite partie de l'échantillon par le dernier diaphragme.



## Microscope Confocal

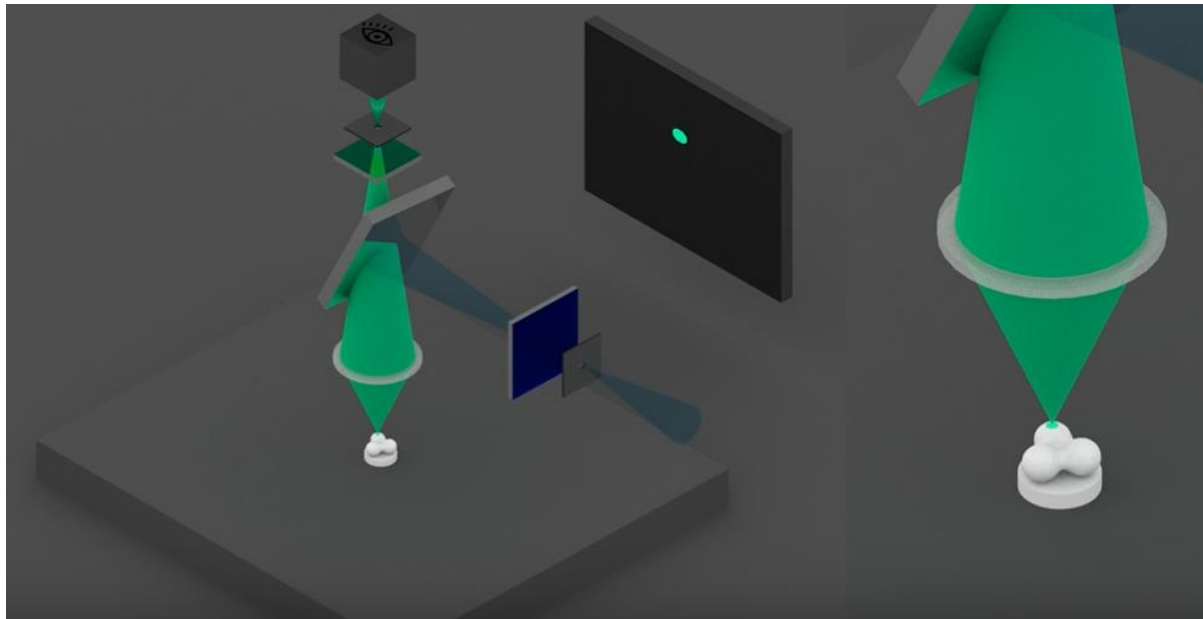
Si des fluorophores sont présents en ce point, ils émettent une lumière ensuite filtrée par le miroir dichroïque et un filtre.



## Microscope Confocal

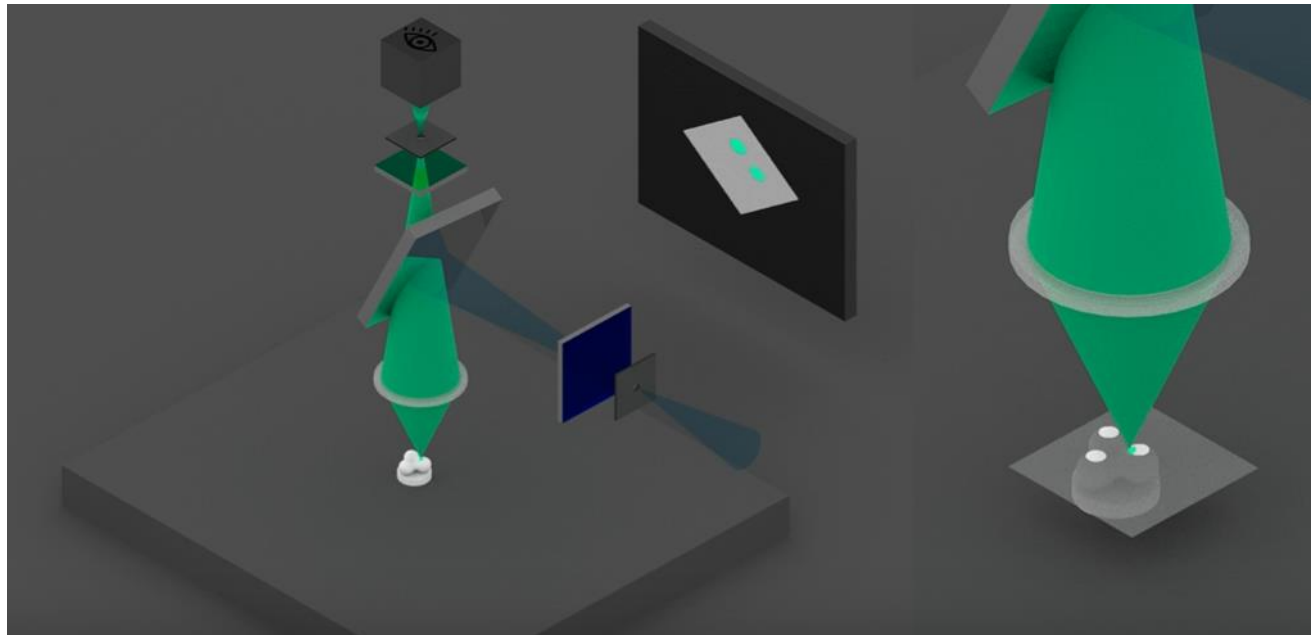
Un deuxième diaphragme est placé au point de focalisation du faisceau. Il ne laisse passer que la lumière venant du point visé dans l'échantillon.

L'objectif ne détecte donc que ce point visé dans l'échantillon.



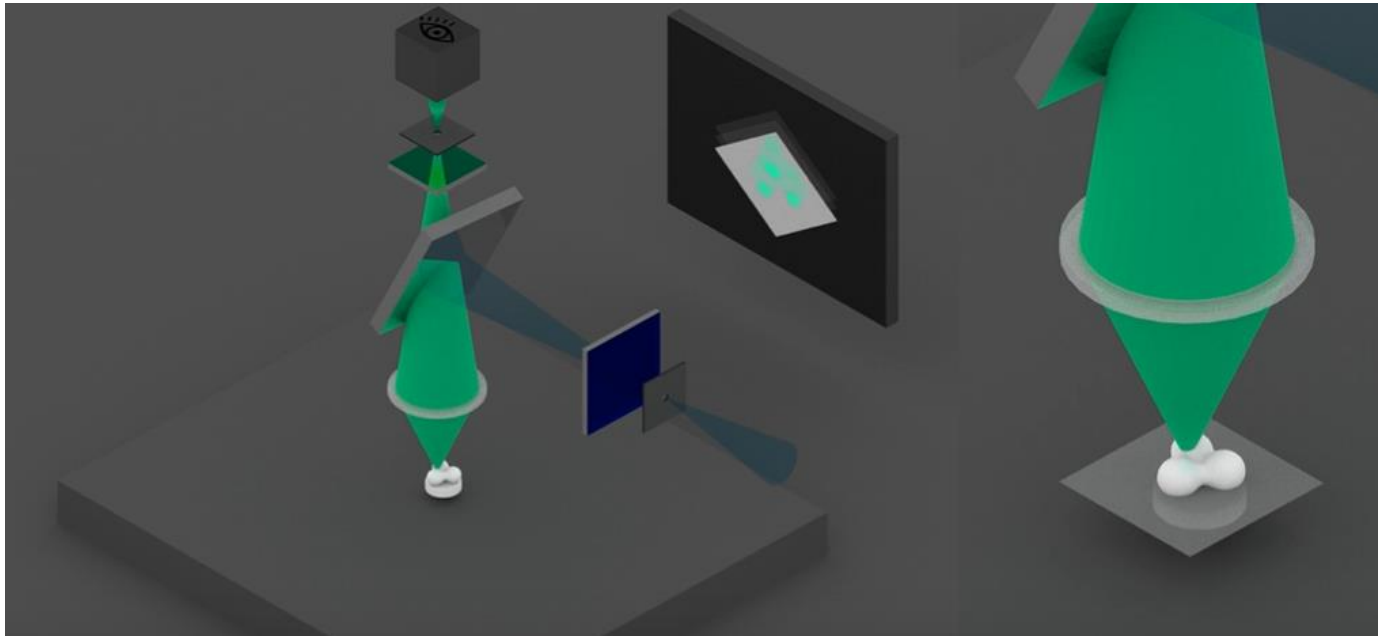
## Microscope Confocal

On déplace ensuite soit l'échantillon soit le montage optique. Cela permet de balayer la surface de l'échantillon avec le faisceau pour en former l'image de fluorescence à une hauteur précise.



## Microscope Confocal

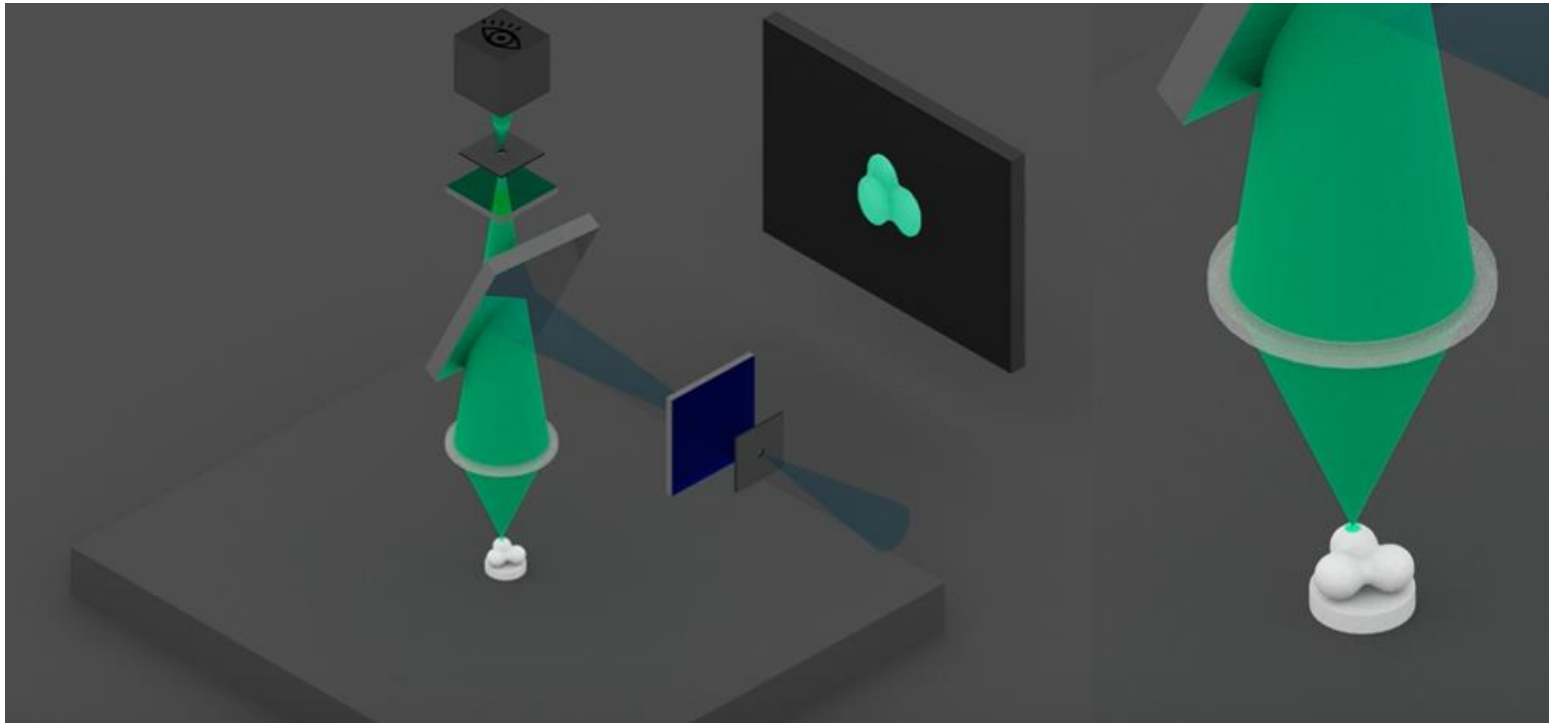
- On peut ensuite déplacer le faisceau verticalement puis recommencer pour obtenir ainsi différents plans de coupes.
- Un traitement informatique permet finalement de reconstituer l'image de volume.





## Microscope Confocal

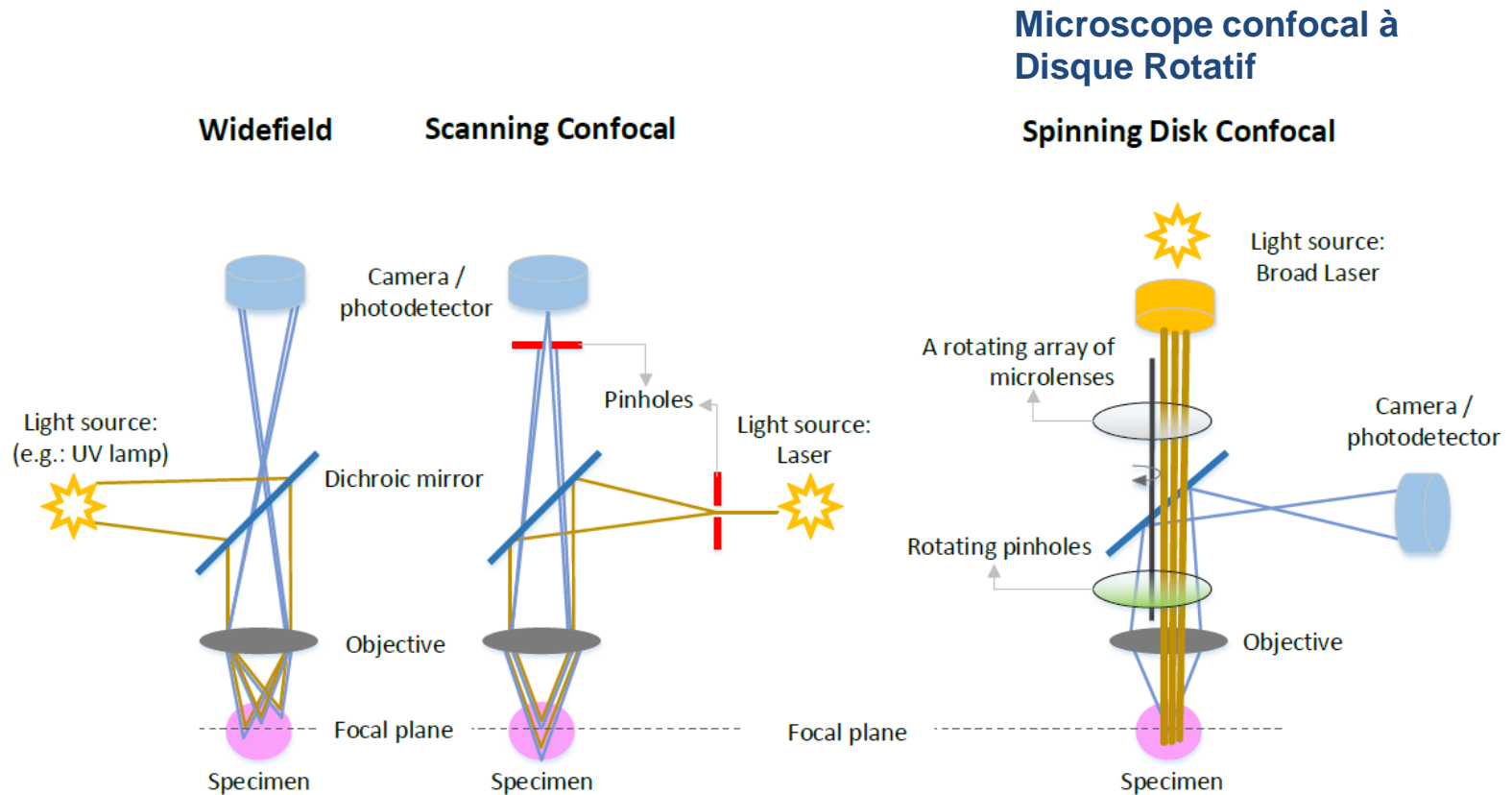
Le microscope confocal permet ainsi de détecter les molécules fluorescentes avec une bonne résolution spatiale à trois dimensions.



# Techniques de Microscopie

- Widefield
- Confocal
- Confocal – Spinning disk
- Photon microscopy
- Super resolution
  - STED microscopy
  - STORM and PALM

# Techniques de Microscopie



**Confocal:** la lumière de la source de lumière (Ls) est focalisée à travers un trou d'épingle pour une illumination (Pi) et ensuite dans l'échantillon (S), ce qui donne un volume relativement petit.

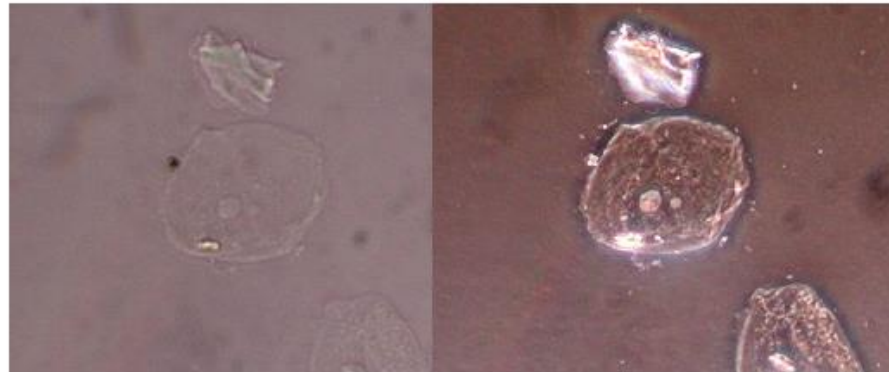
**Widefield:** Le volume total de l'échantillon est exposé à la lumière.

# Techniques de Microscopie

## Widefield

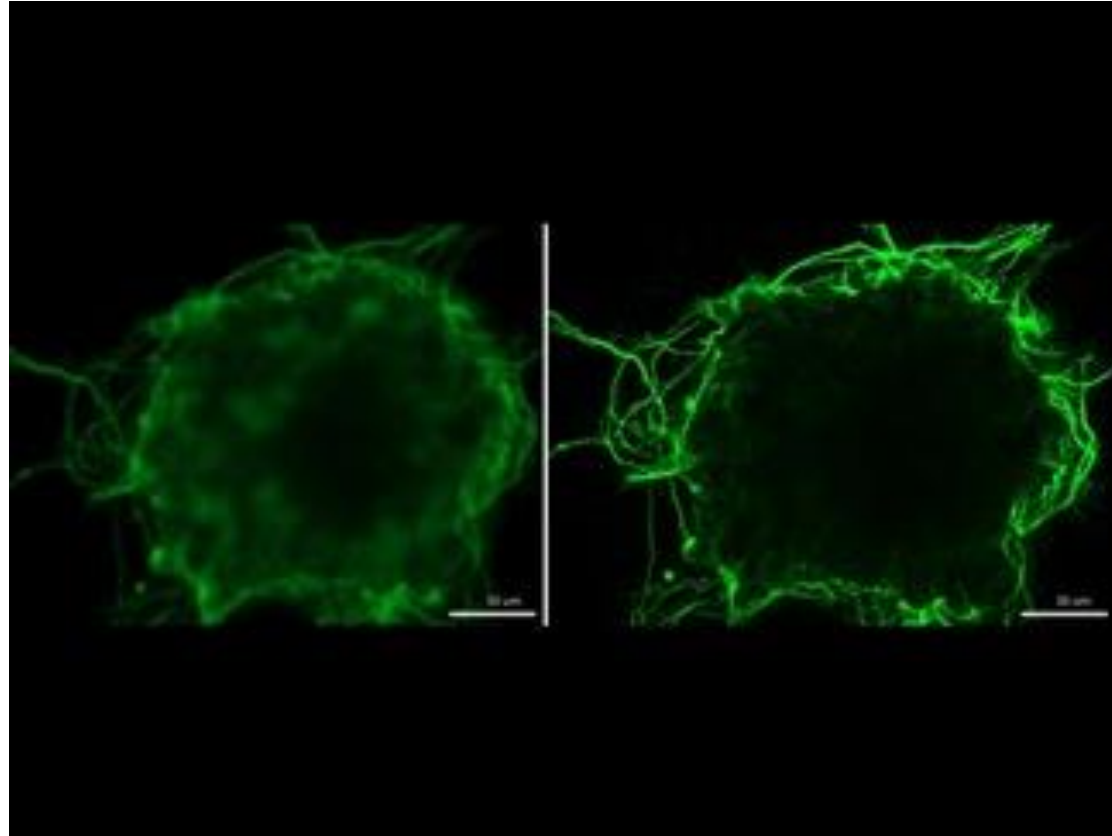
Brightfield

Phase contrast



Le microscope à contraste de phase est un microscope qui exploite les changements de phase d'une onde lumineuse traversant un échantillon.

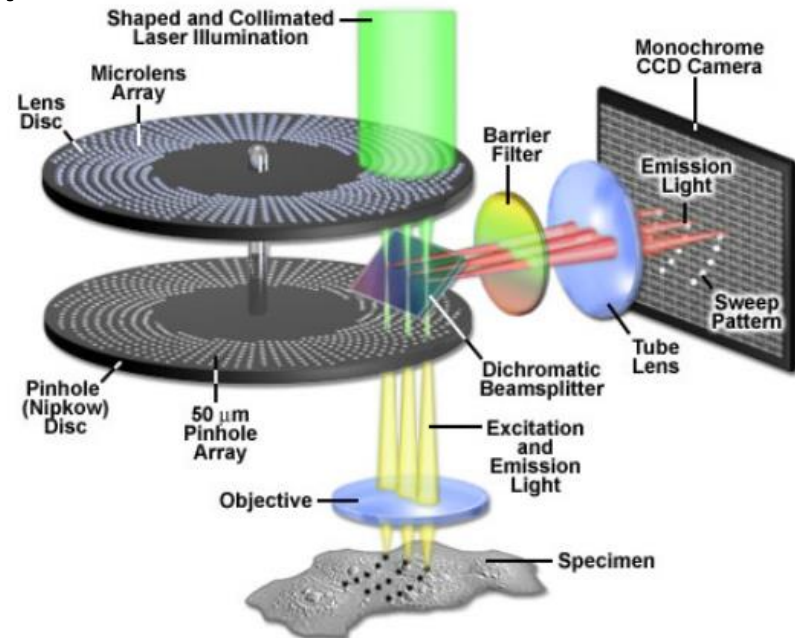
# Techniques de Microscopie



Widefield montré à gauche à côté de l'image confocale à droite.

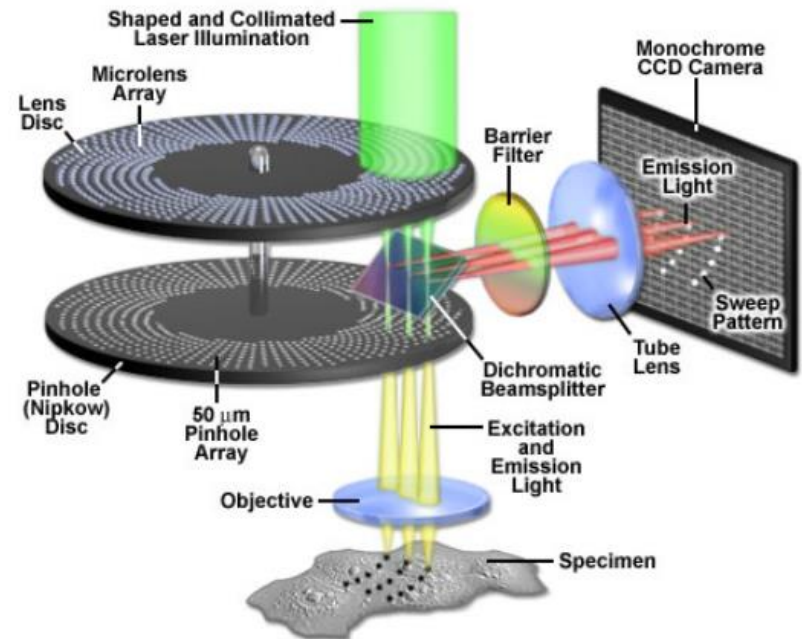
# Microscope confocal à Disque Rotatif

- La source d'illumination utilisée est en général un laser.
- Le chemin de la lumière d'excitation passe par une partie du disque de pinhole qui va diviser l'illumination de l'échantillon en plusieurs centaines de points.



# Microscope confocal à Disque Rotatif

- Lorsque le disque tourne, la position en spirale des pinhole permet d'illuminer entièrement l'échantillon douze fois par tour.
- La fluorescence réémise par l'échantillon est collectée par l'objectif avant de traverser le disque de pinholes.



## Microscope confocal à Disque Rotatif

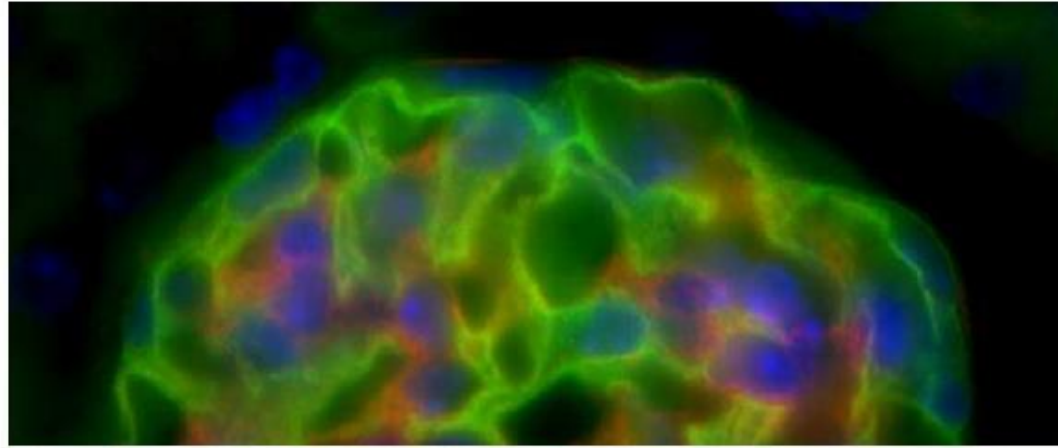
- Le microscope confocal à balayage rotatif permet d'obtenir une image avec une résolution axiale proche de celle obtenue avec un confocal à balayage laser conventionnel.
- Mais permet des **acquisitions très rapides** et limite considérablement le photoblanchiment et la phototoxicité.



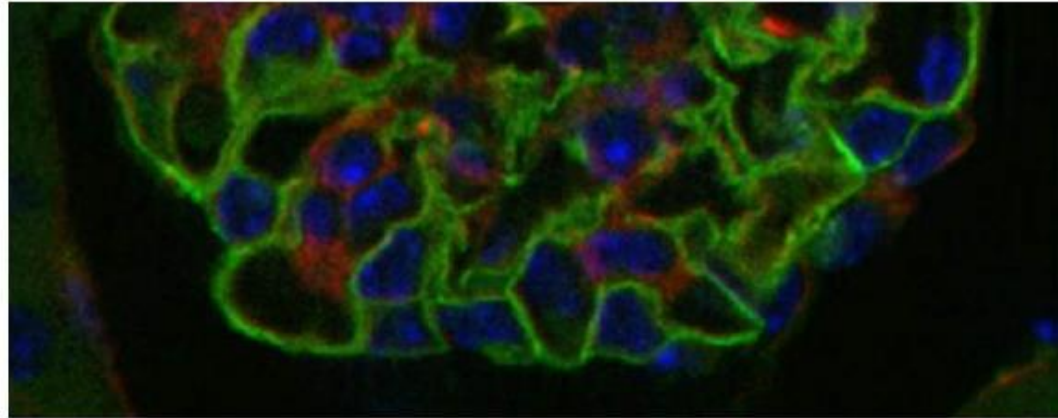
# Techniques de Microscopie

## Confocal - Laser scanning

Confocal

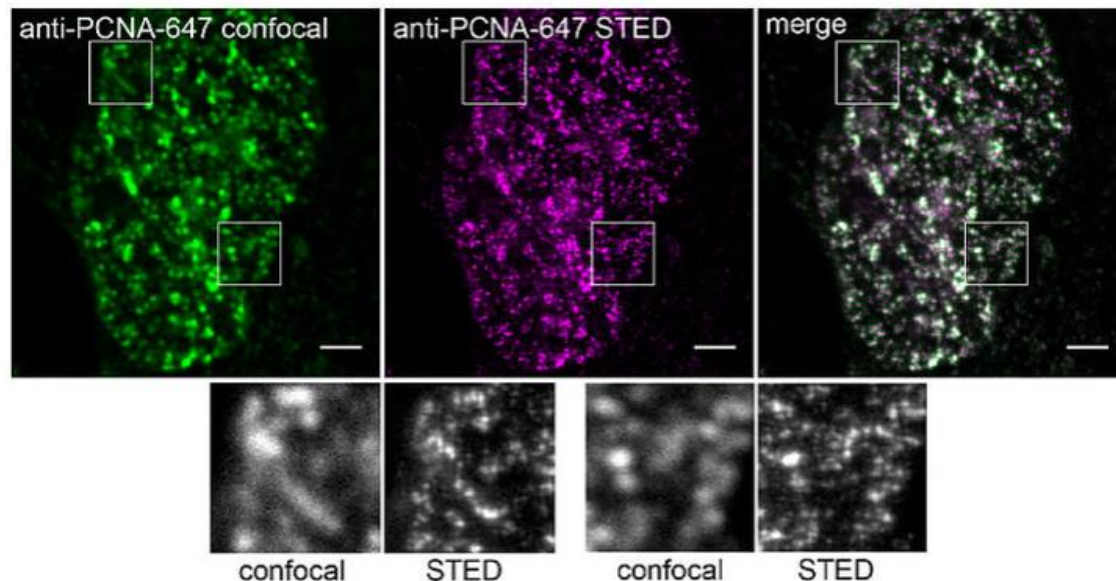


Widefield



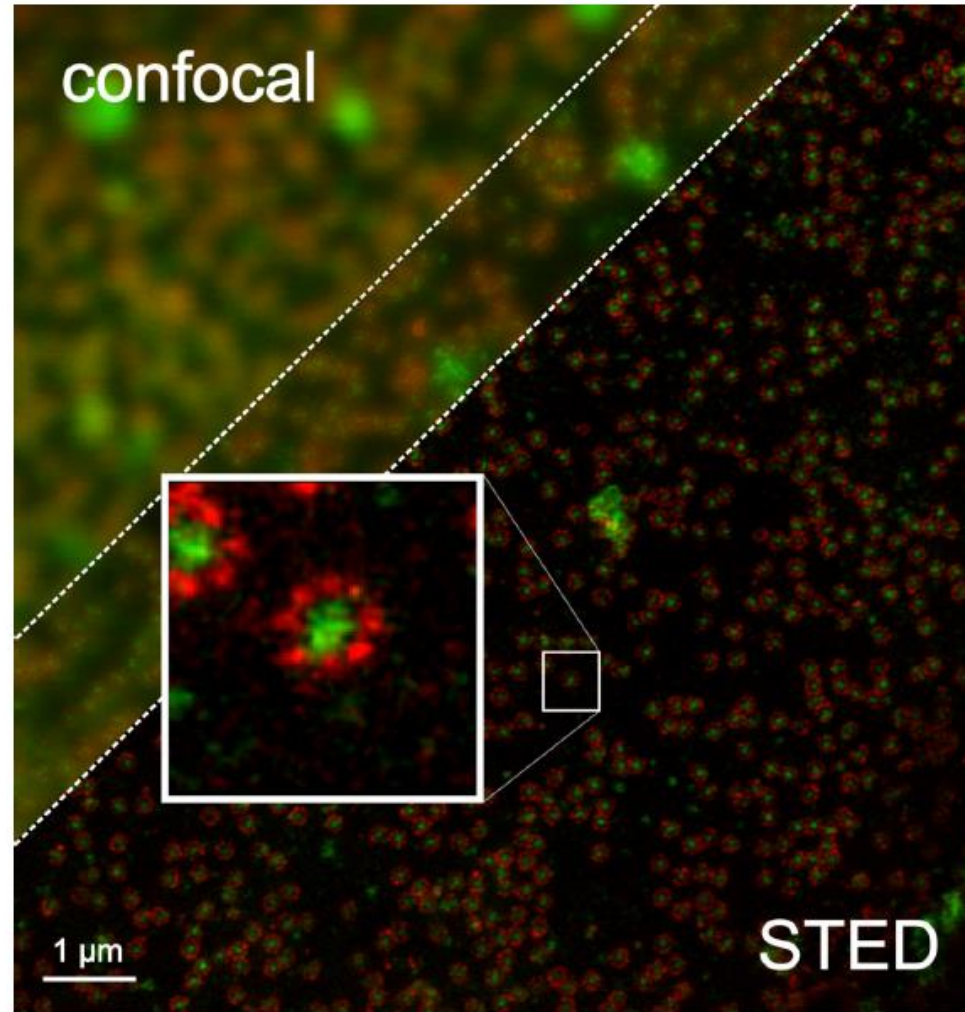
## Microscopie STED

- Le microscope STED (stimulated-emission-depletion) est basé sur un microscope à fluorescence confocal à balayage.
- **Principe** : étouffer l'excitation des molécules périphériques
- Le moyen sans doute le plus direct pour affiner le point focal de fluorescence est d'inhiber sélectivement la fluorescence dans ses parties extérieures.



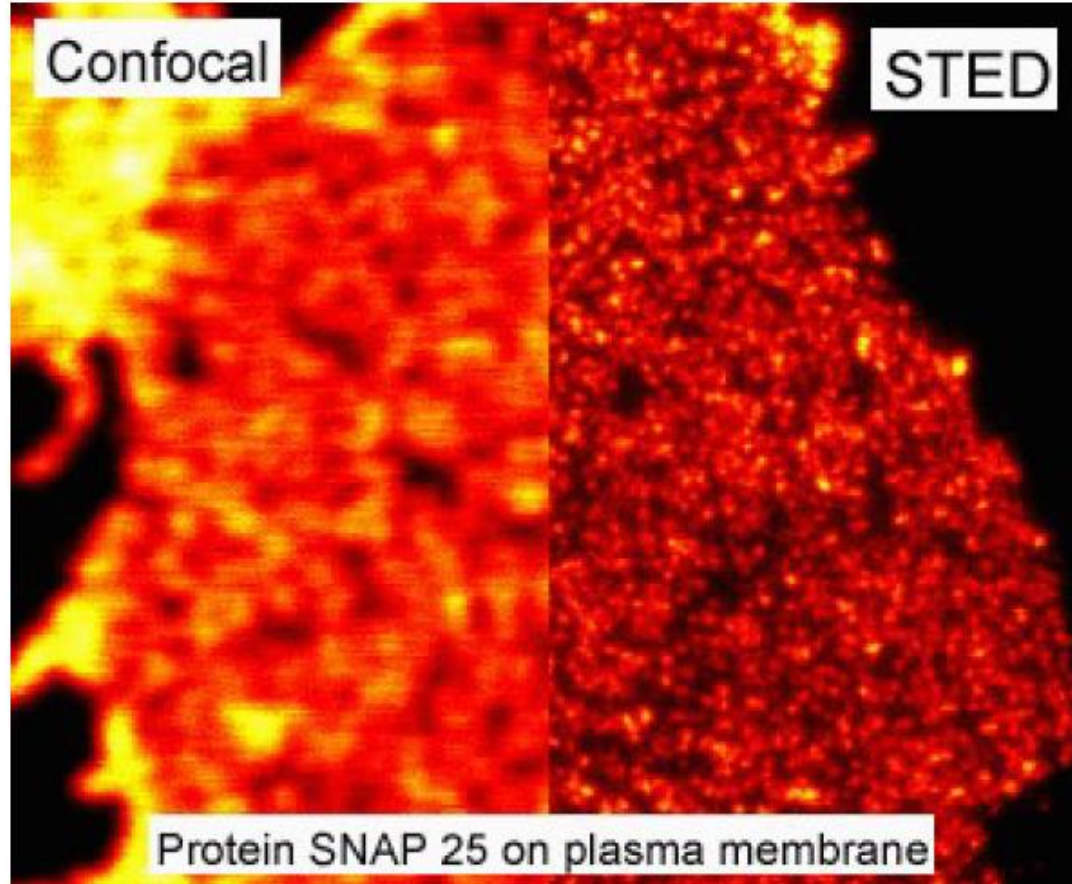
# Techniques de Microscopie

## STED microscopy



# Techniques de Microscopie

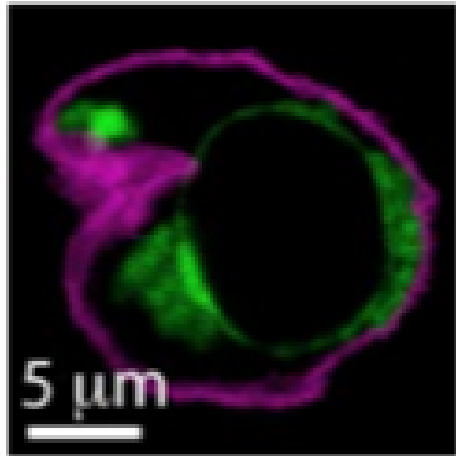
## STED microscopy



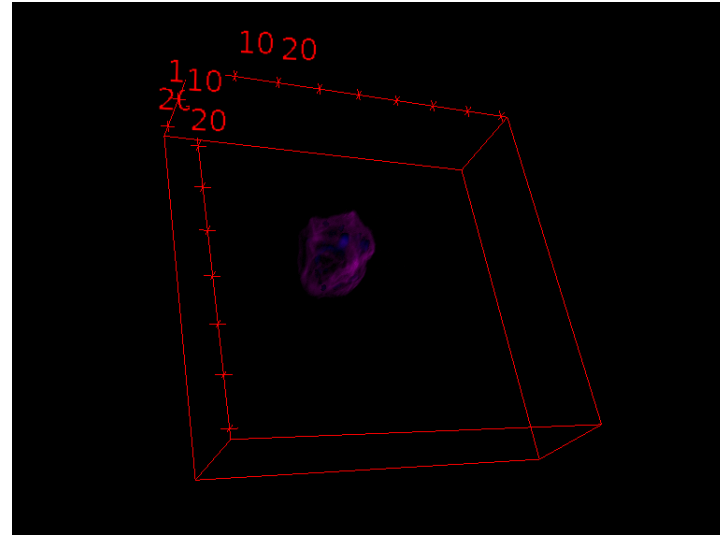


## Types d'images

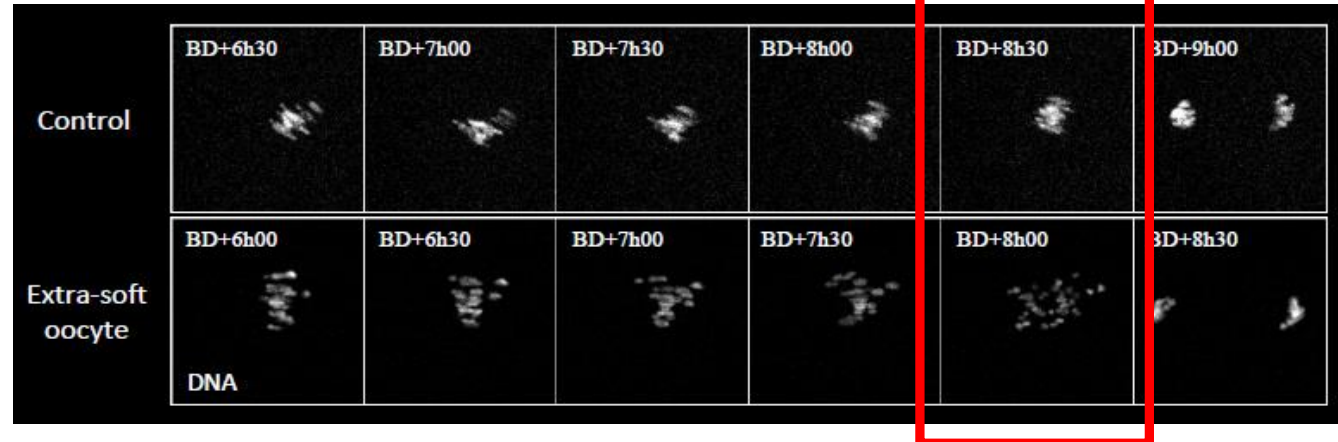
Images 2D



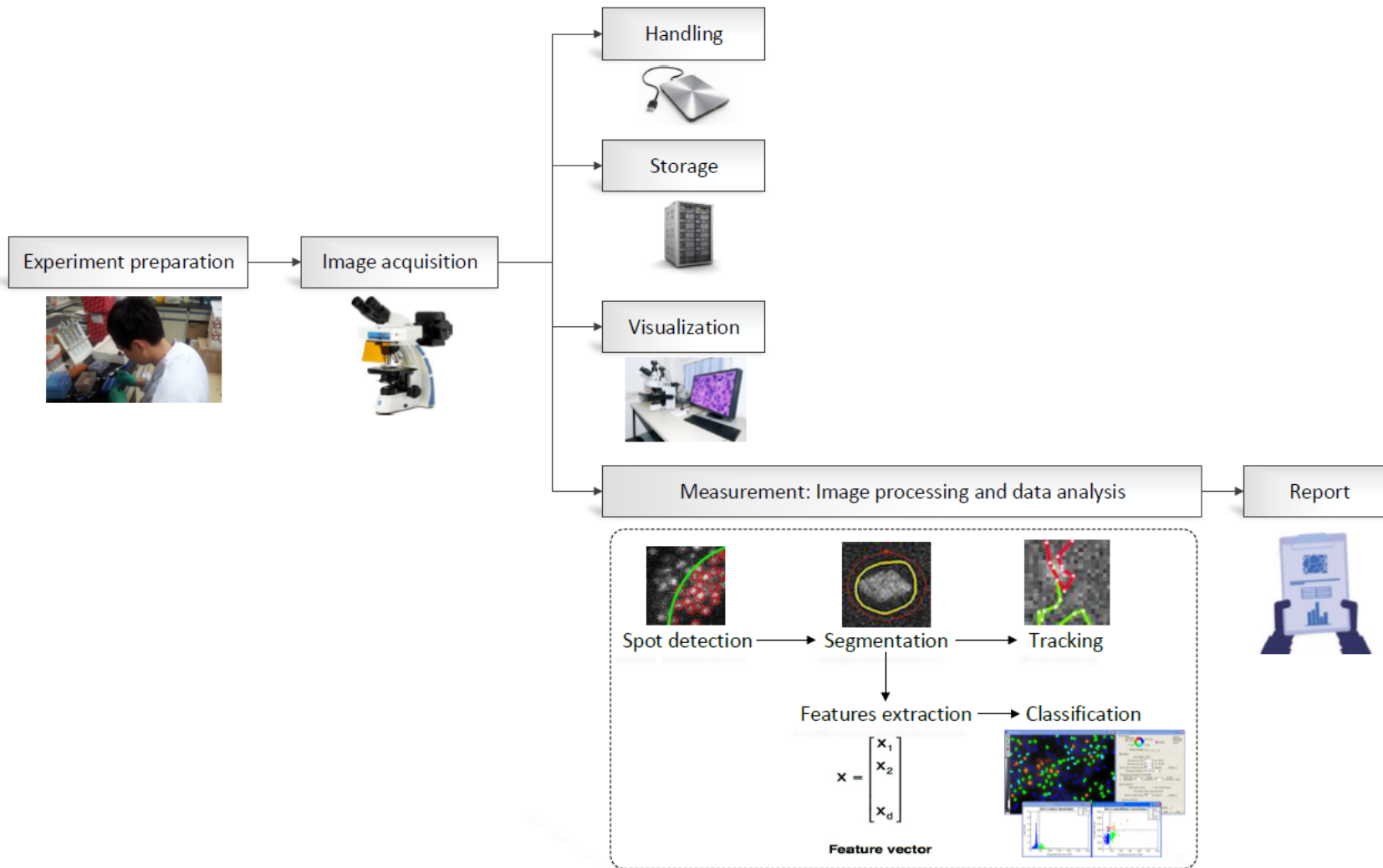
Images 3D



Images + t



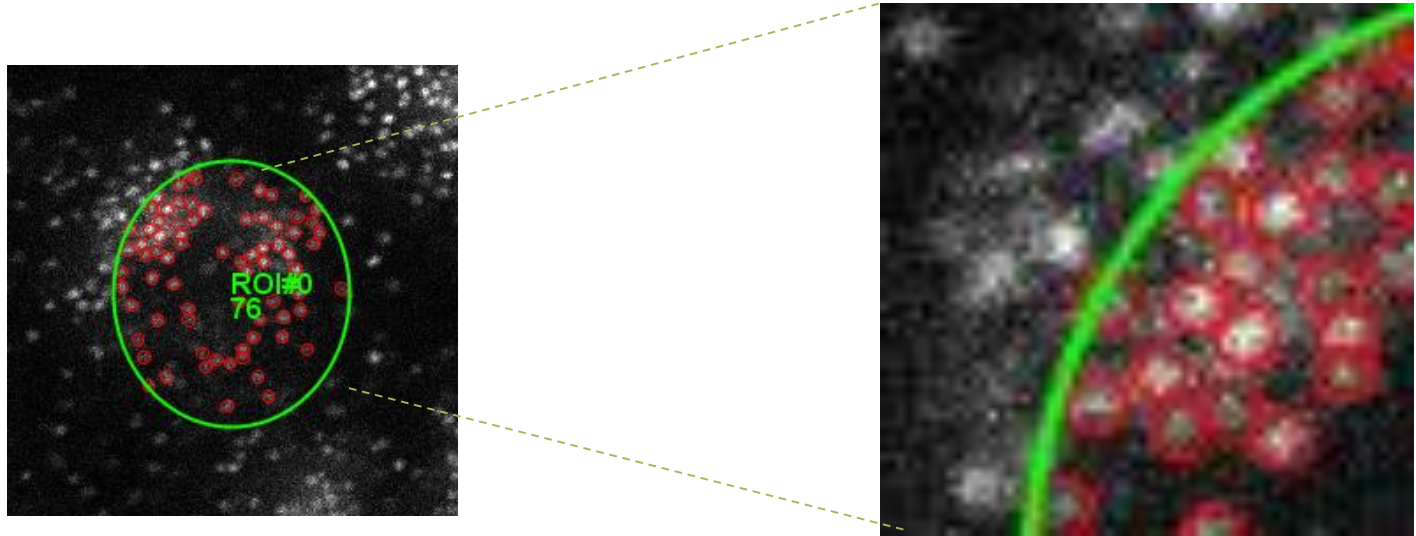
# Chaîne d'analyse d'images en Biologie



Les différents opérations de traitement d'images biologiques:

- **Spot detection**
- **Segmentation**
- **Extraction des caractéristiques**
- **Classification des images**
- **Projection des images 3D en 2D**
- **Reconstruction 3D**
- **Tracking/Suivi**
- **Analyse du mouvement,**
- **Etc.**

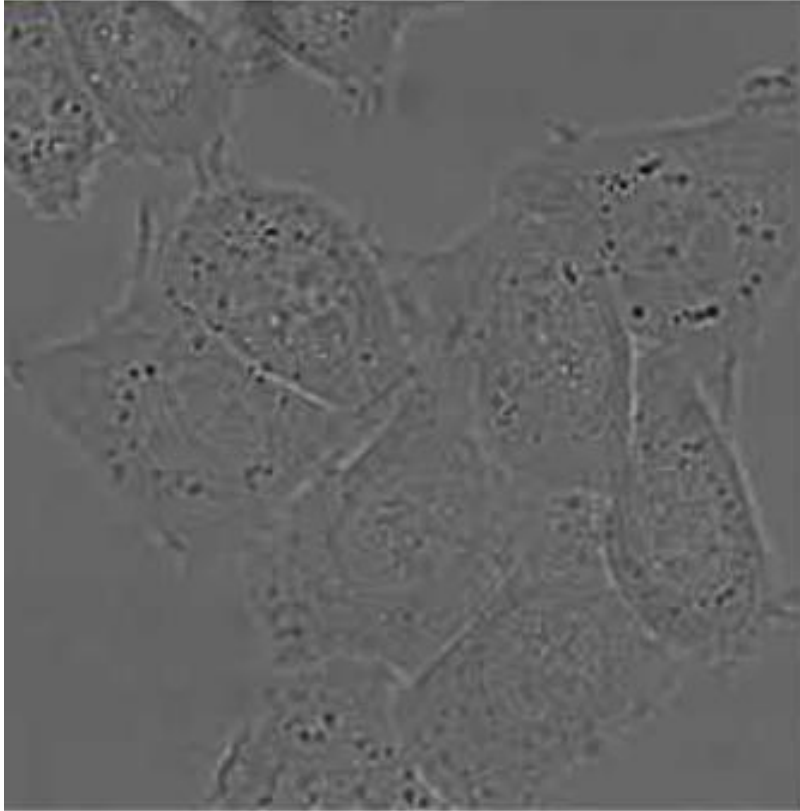
## Spot Detection



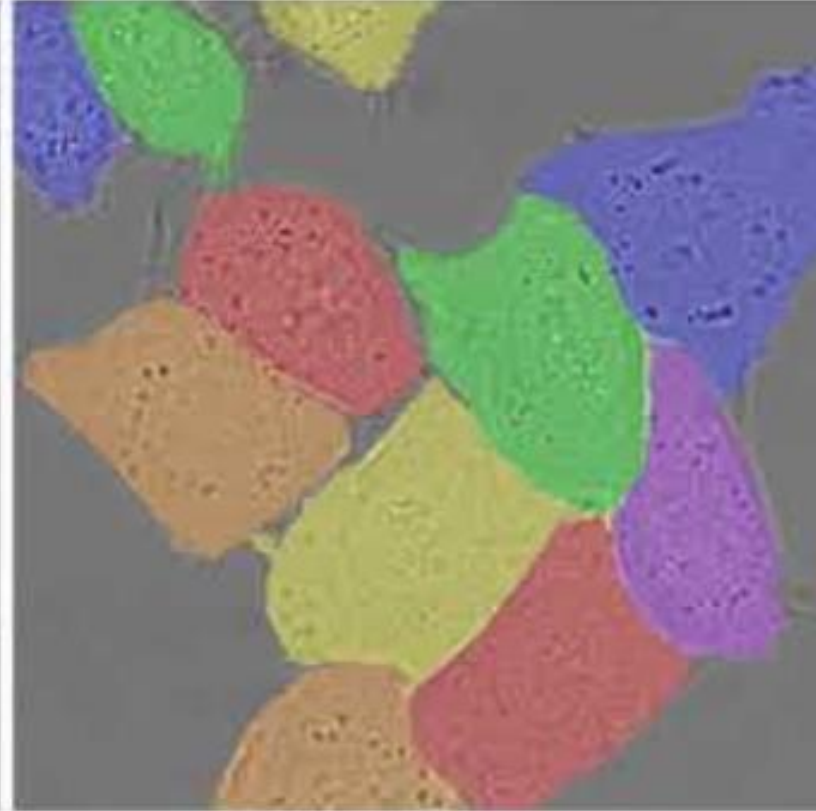
- Détection les tâches dans les images bruitées 2D / 3D.
- Les tâches peuvent être des noyaux ou des cellules



# Segmentation

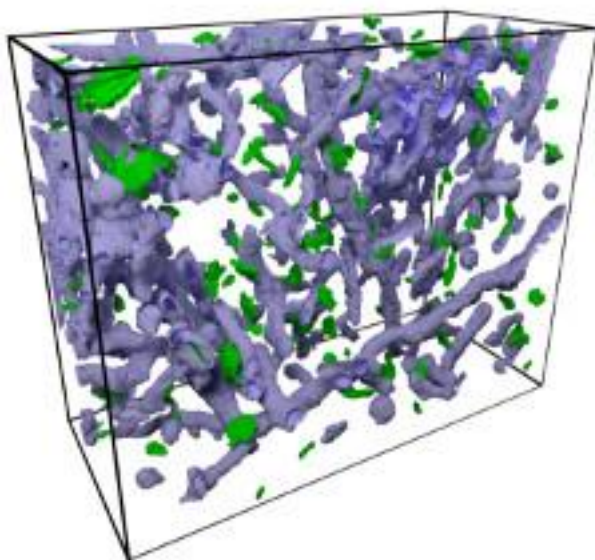
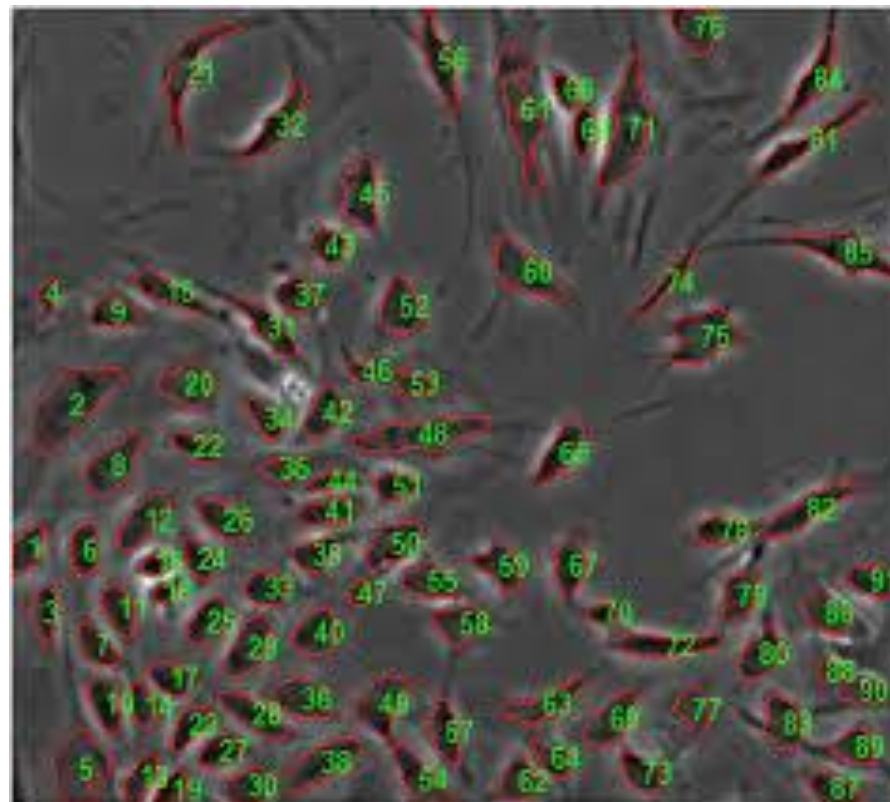
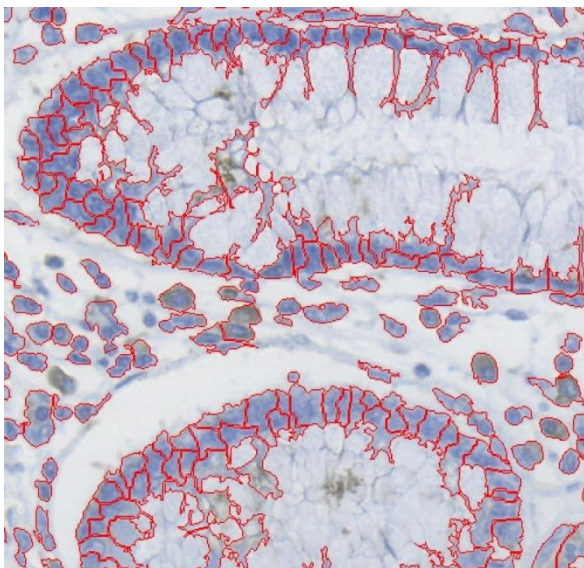


HeLa cells recorded with DIC microscopy

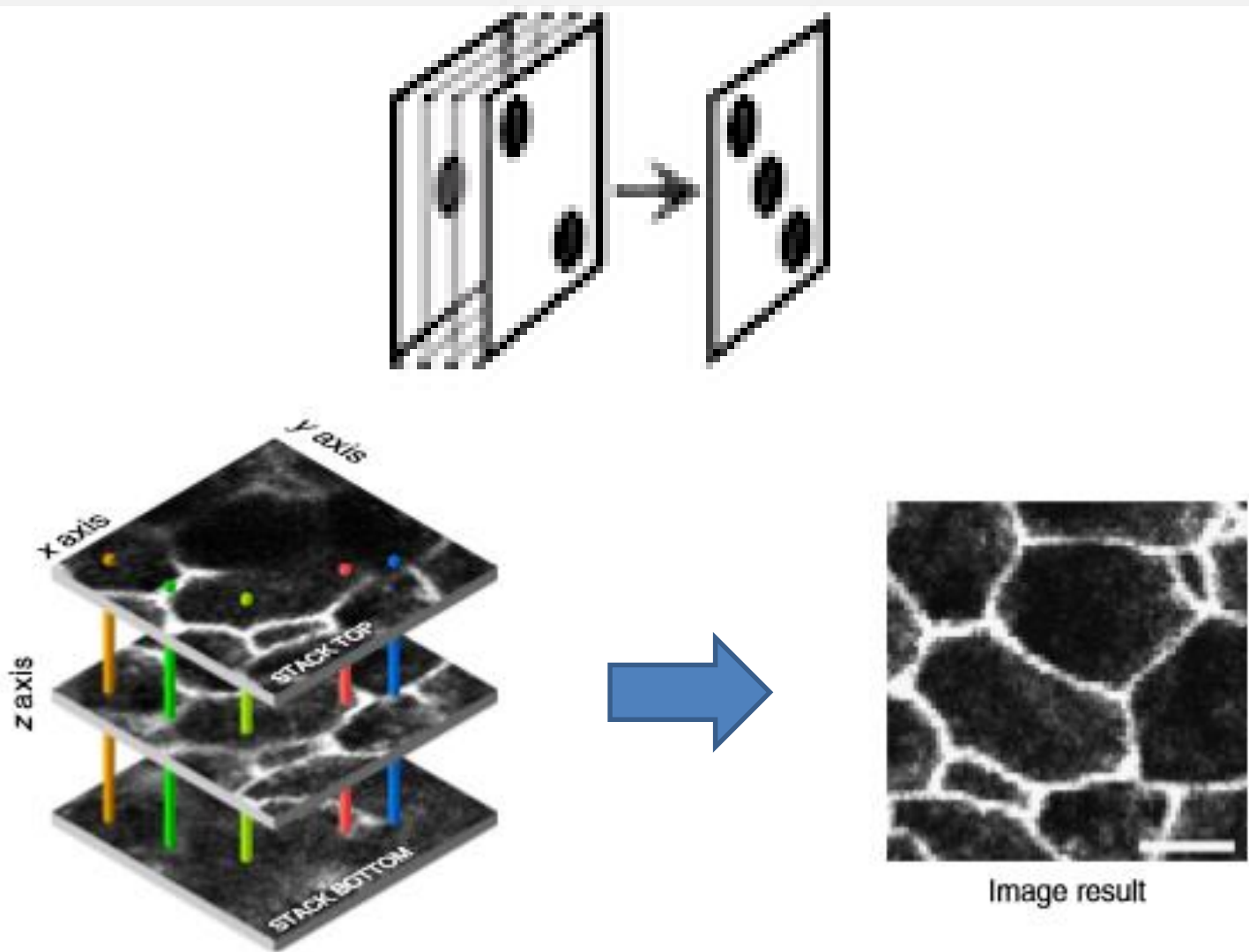


manual segmentation  
(colors: different instances)

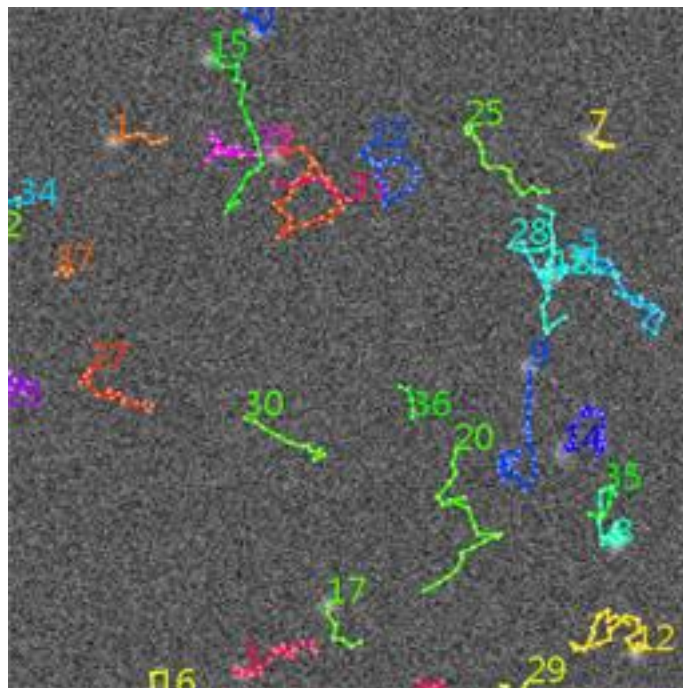
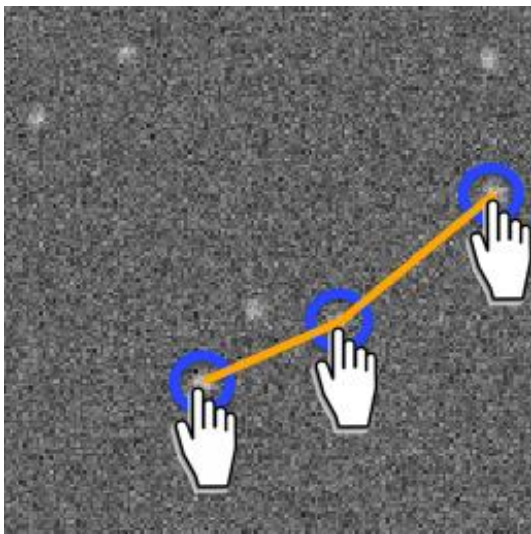
# Segmentation



# Z-stack projection

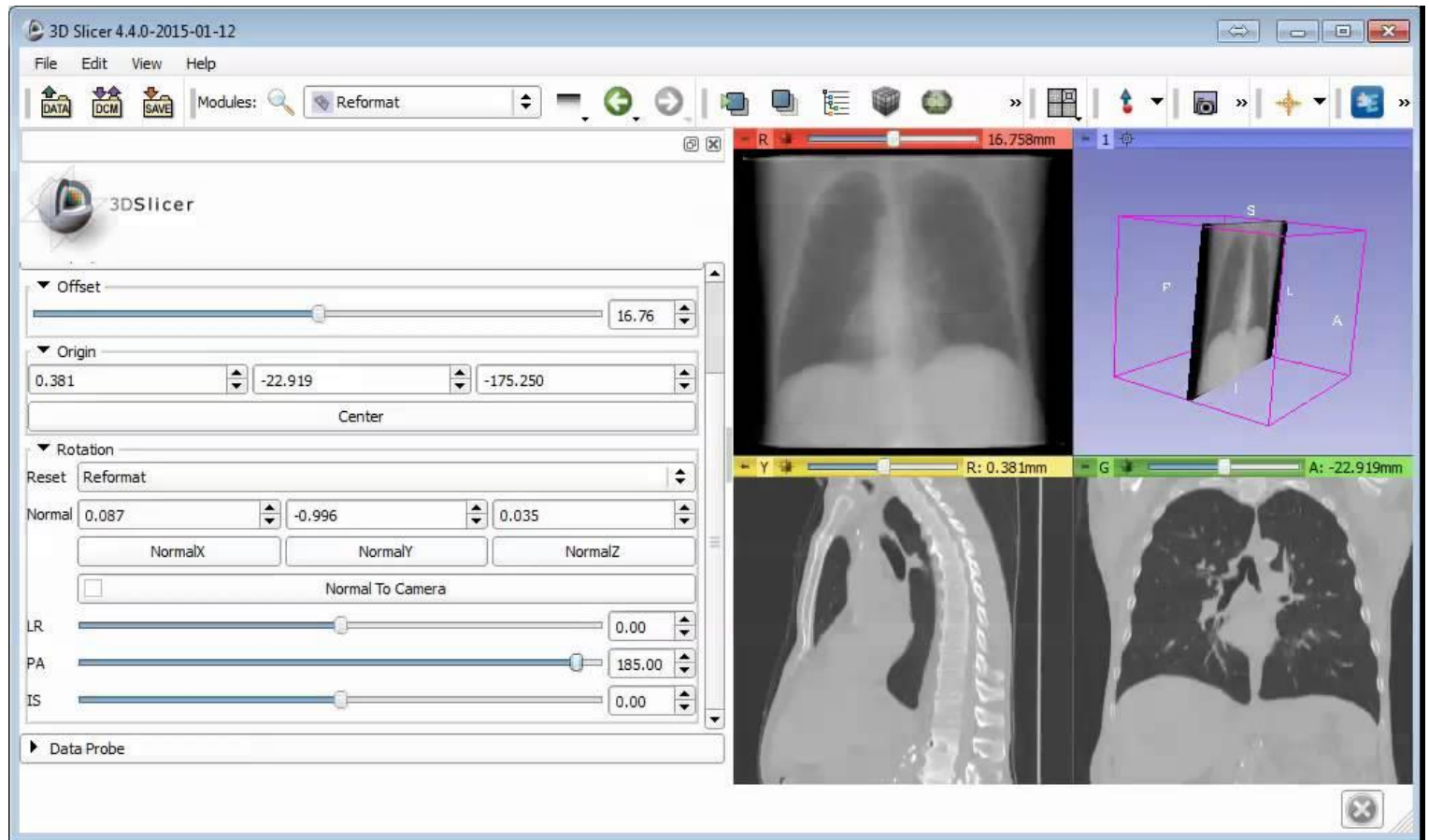


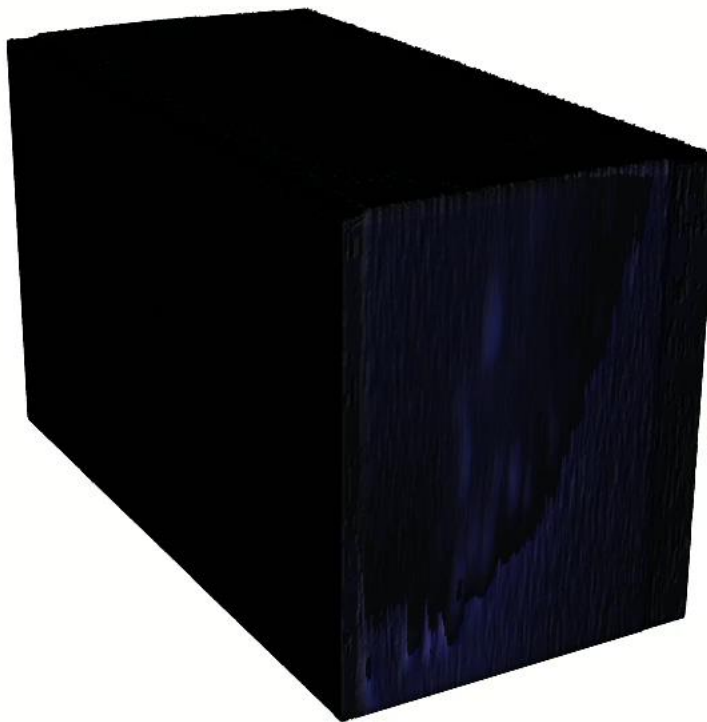
## Tracking/Suivi





# Visualisation





## ■ Logiciels OpenSource

- ImageJ
- Fiji
- ICY
- CellProfiler
- CellXplorer
- SLICER 3D
- HCS-Analyzer

## ■ Logiciels Payants

- Imaris

# Exemples d'applications de traitement d'images en Biologie

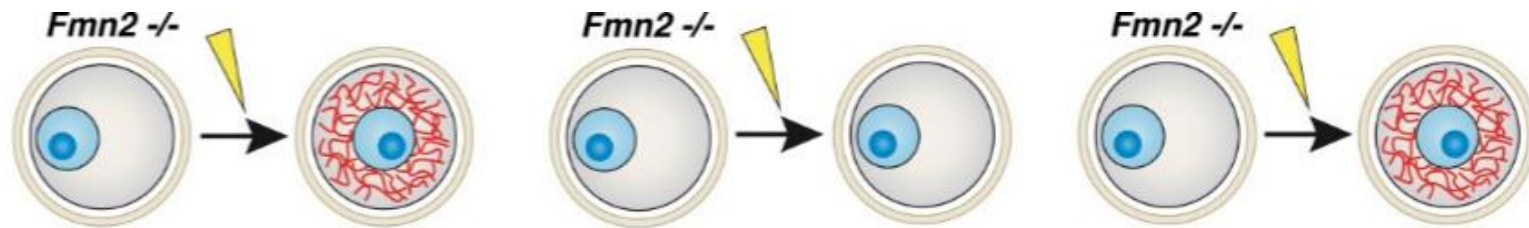
## **PROJECT 1**



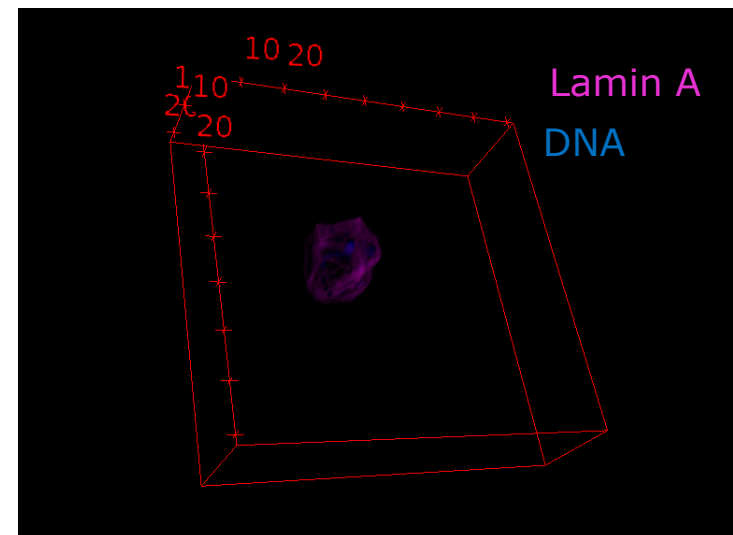
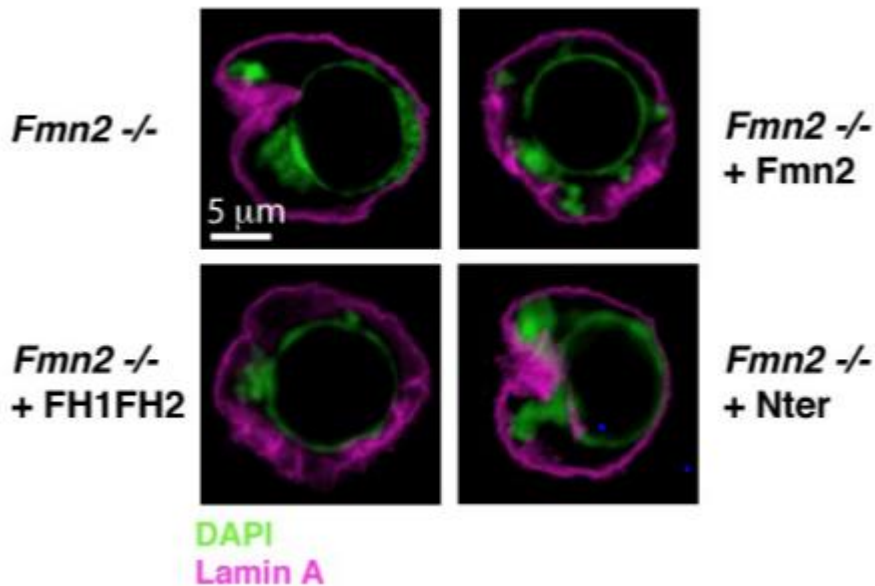
# Morphological changes occurring during the asymmetric division of oocytes in mouse on 3D confocal images

## Goal

Compare the morphological changes of different conditions of mouse oocytes (Ctrl, knock-out of Formine2, the full rescue of the formine2 and the rescue of FH1/FH2).



## Data



# Morphological changes occurring during the asymmetric division of oocytes in mouse on 3D confocal images

## Computational Approach

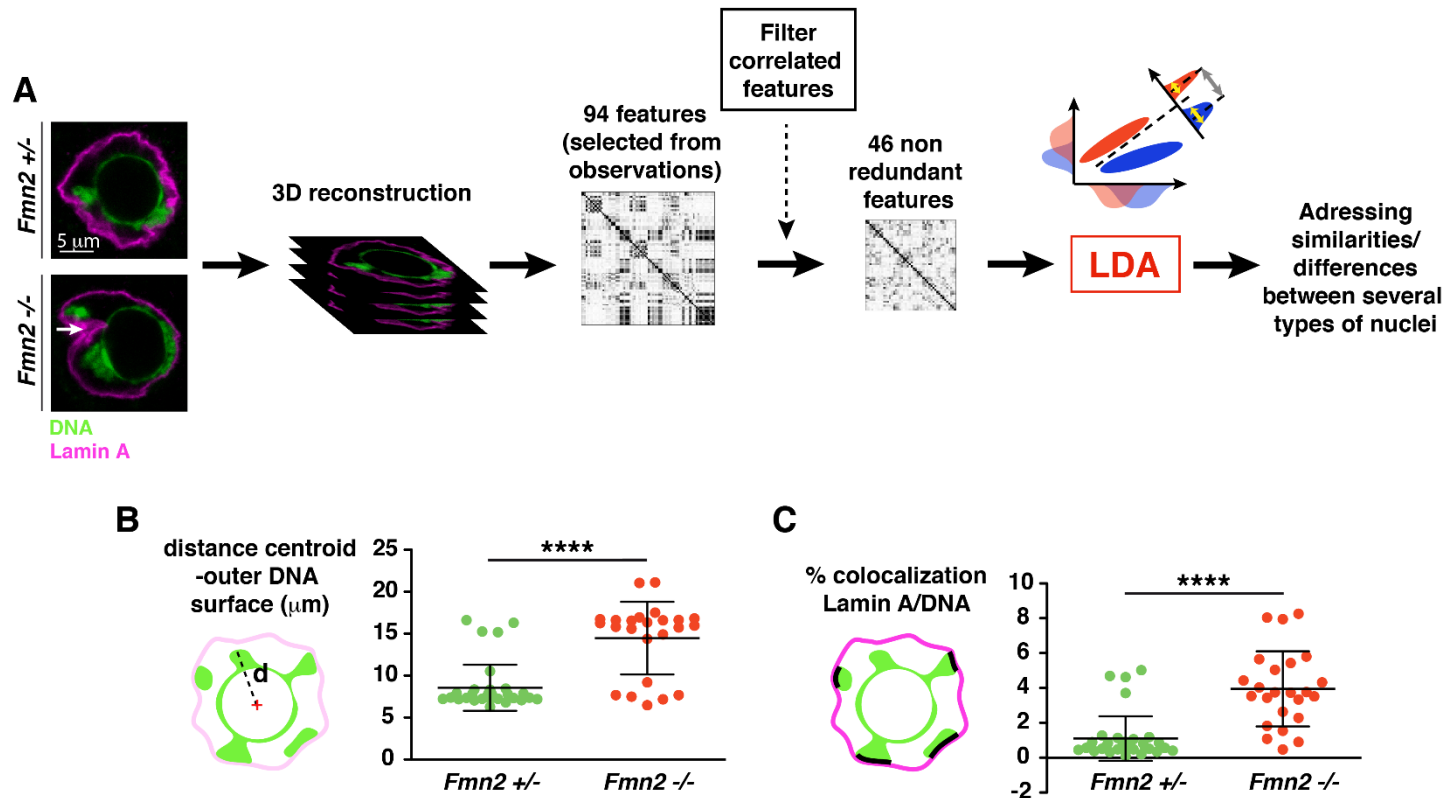
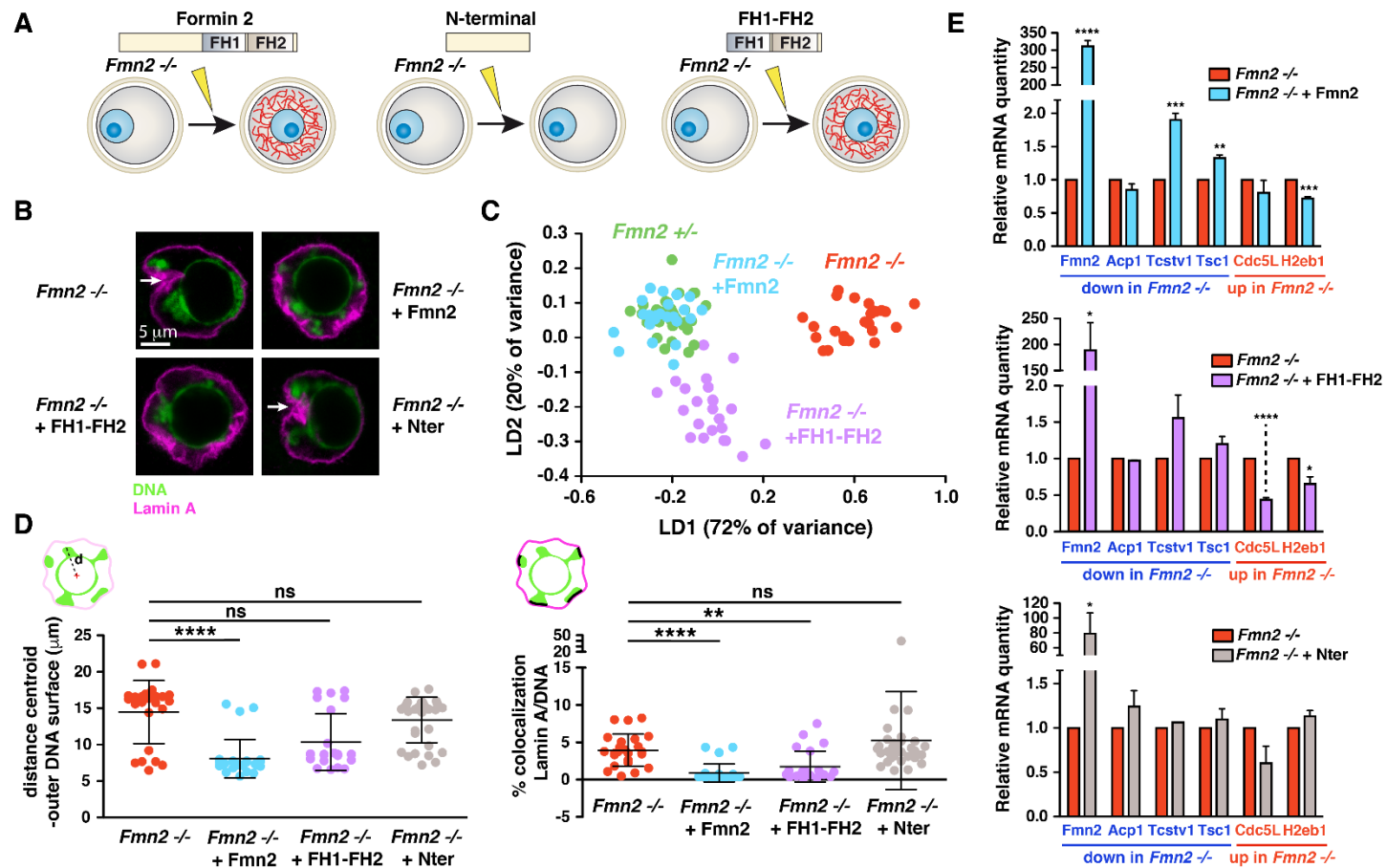


Figure 1

■ Maria Almonacid\*, Alice Othmani\*, Stephany El-Hayek, Isabelle Queguiner, Fanny Couplier, Sophie Lemoine, Leila Bastianelli, Christophe Klein, Philippe Mailly, Raphaël Voituriez, Auguste Genovesio\* and Marie-Hélène Verlhac\*: **Active fluctuations modulate gene expression in mouse oocytes.** In **Nature** (under revision)

# Morphological changes occurring during the asymmetric division of oocytes in mouse on 3D confocal images



**Figure 3**

■ Maria Almonacid\*, Alice Othmani\*, Stephany El-Hayek, Isabelle Queguiner, Fanny Couplier, Sophie Lemoine, Leila Bastianelli, Christophe Klein, Philippe Mailly, Raphaël Voituriez, Auguste Genovesio\* and Marie-Hélène Verlhac\*: **Active fluctuations modulate gene expression in mouse oocytes.** In **Nature** (under revision)

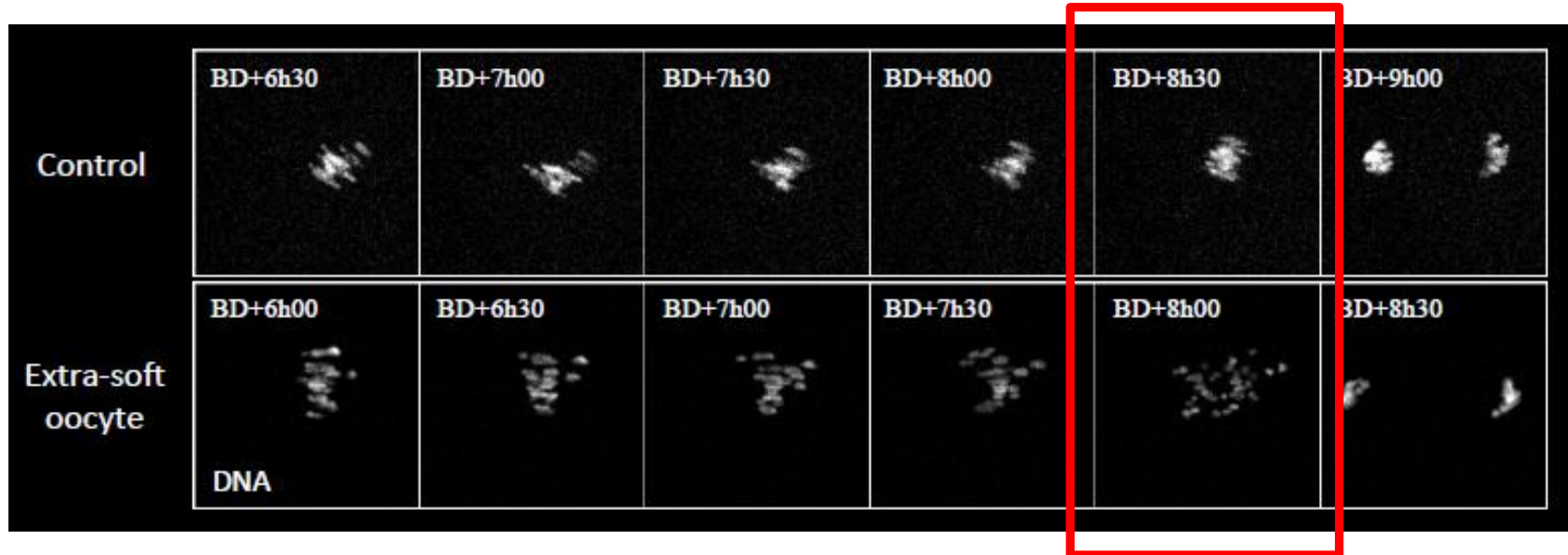
# Exemples d'applications de traitement d'images en Biologie

## **PROJECT 2**

# Oocyte shape/deformability vs chromosome behavior alignment

Context

Extra-soft oocytes (CVCA) have misaligned chromosomes

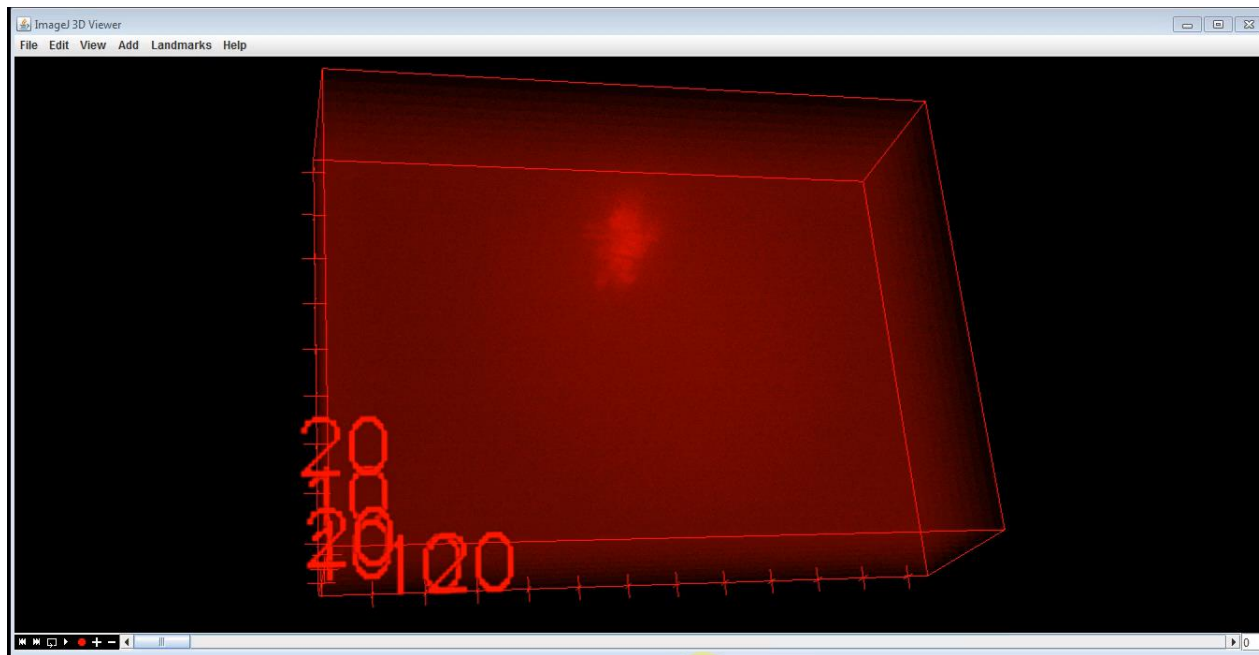


# Oocyte shape/deformability vs chromosomes behavior alignment

## Goal

1. **Quantify the alignment/misalignment of the chromosomes**
2. Find the correlation between the oocyte shape/deformability and the chromosome behavior/alignment

## Data



# Oocyte shape/deformability vs chromosomes behavior alignment

## Computational Approach

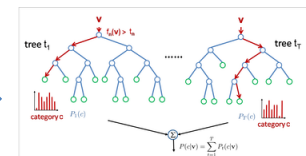
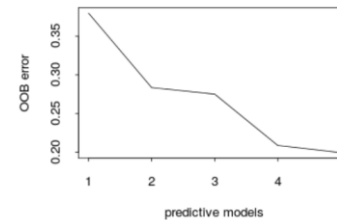
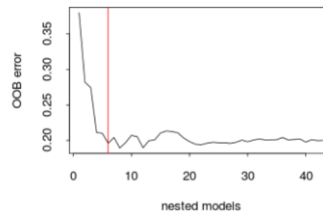
Time-lapse  
microscopic  
images

3D rough +  
refined  
segmentation

Features selection  
for interpretation

Features selection  
for prediction

10-fold cross  
validation  
using selected features



	predicted	
observed	CTRL	CVCA
CTRL	33	2
CVCA	4	100

# Exemples d'applications de traitement d'images en Biologie

## **PROJECT 3**



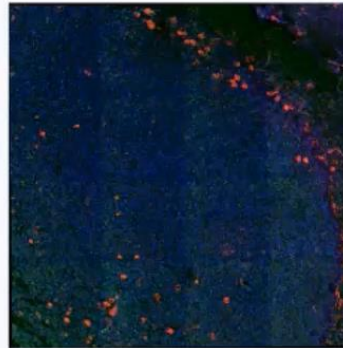
## Compariason among tissues



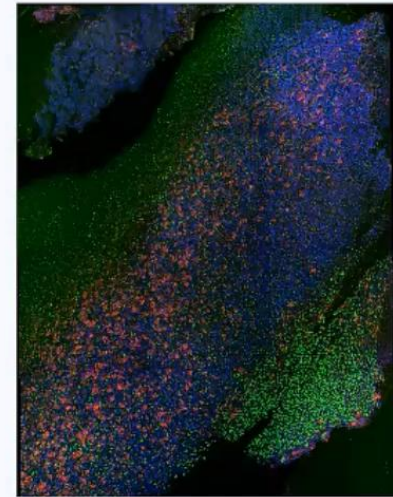
P1 brain



P1 brain



P1 brain



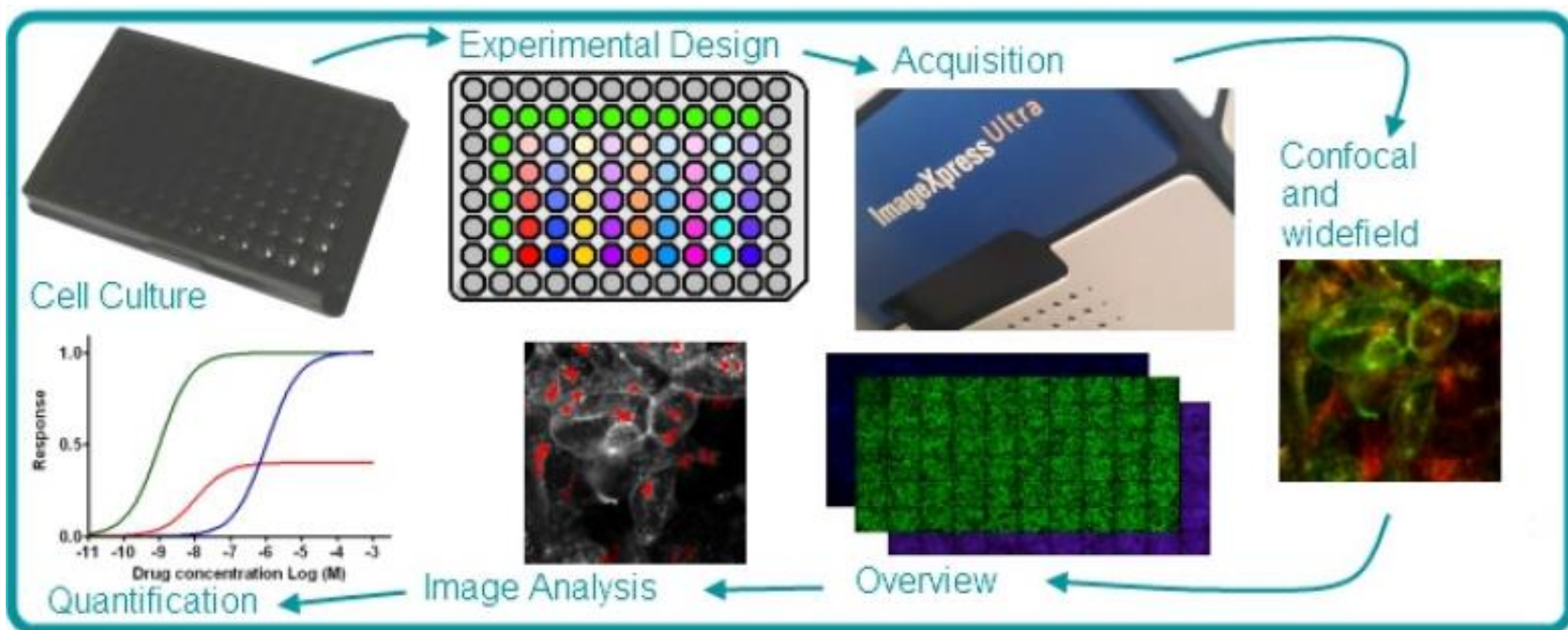
P3 brain

# Exemples d'applications de traitement d'images en Biologie

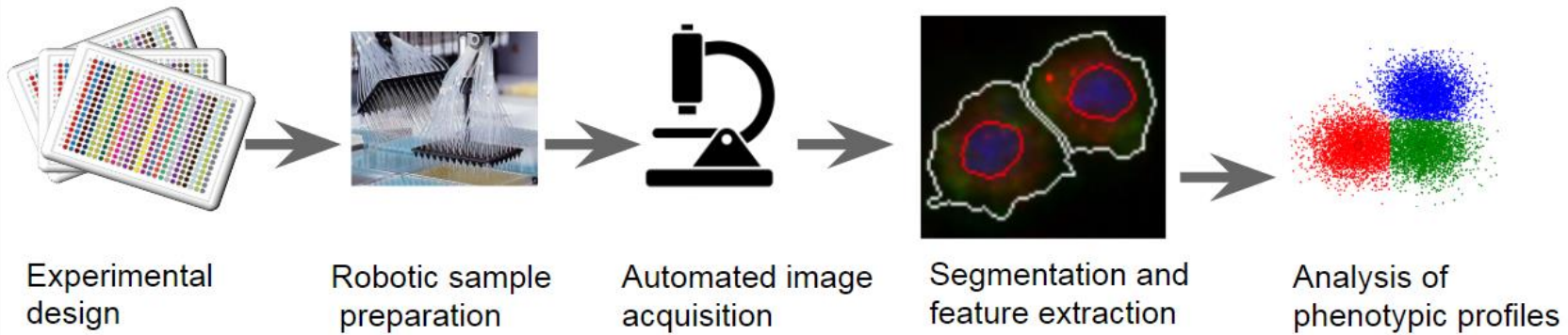
## **PROJECT 4**

# Criblage à haut débit ou High Content Screening (HCS)

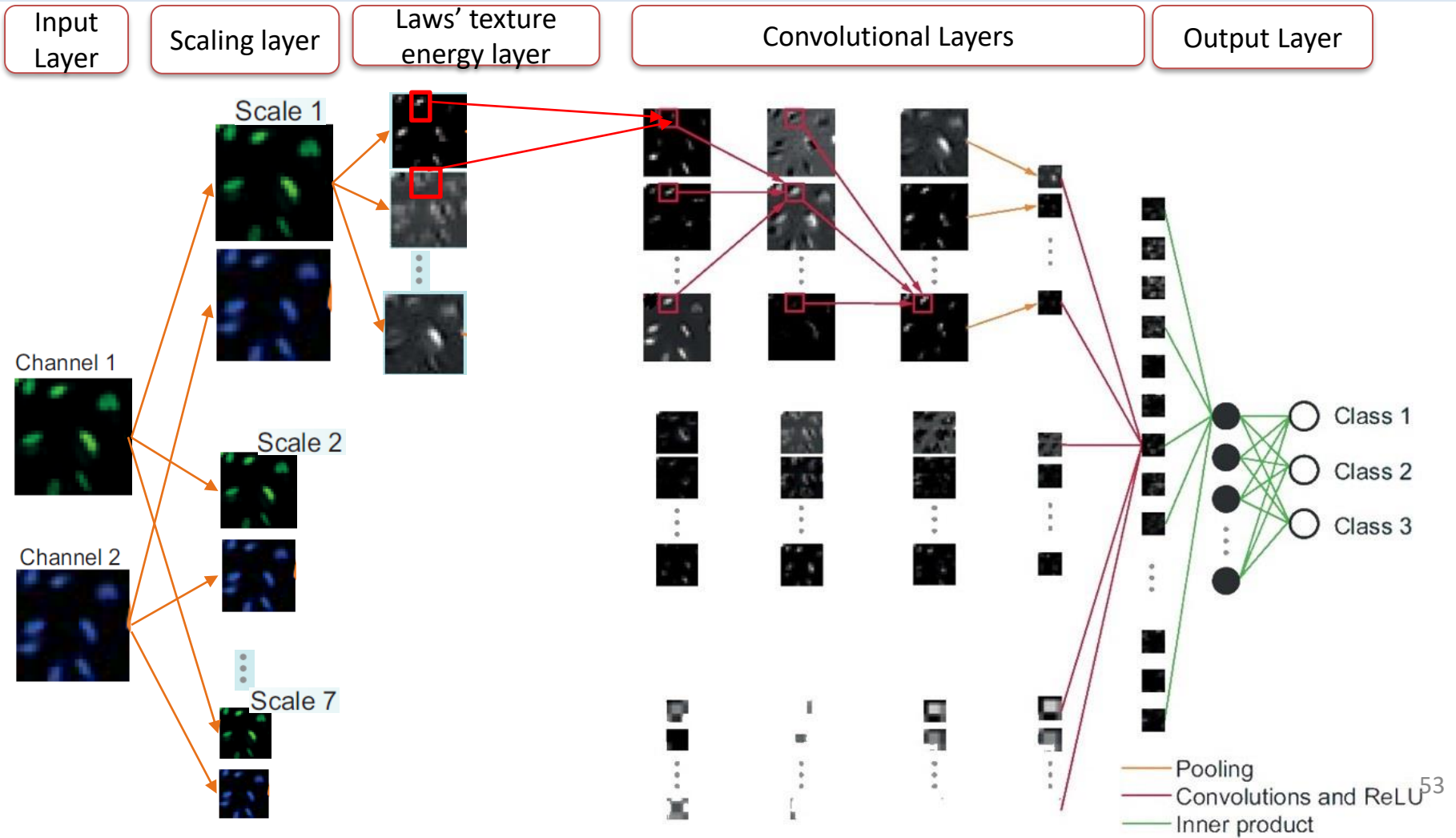
Le criblage cellulaire haut débit vise à **identifier**, parmi **des milliers de molécules naturelles ou synthétiques**, celles qui possèdent une **activité** intéressante au niveau de la cellule, soit en modifiant une **fonction cellulaire** particulière, soit en agissant sur la cellule dans son ensemble. ce travail de grande ampleur s'effectue grâce à un ensemble **d'appareillages automatisés**, combinant la **robotique**, **l'informatique** et la **bio-informatique**.



# Chaîne d'analyse d'images en HCS



# A multi-scale Laws convolutional Neural Network



# A multi-scale Laws convolutional Neural Network for phenotyping High-throughput cellular images

Dataset	AlexNet	GoogleNet	M-Laws-CNN
BBBC013 <sup>1</sup>	50 %	50%	87%
BBBC014 <sup>1</sup>	50%	50%	87%
BBBC015 <sup>1</sup>	50%	50%	87%
BBBC016 <sup>1</sup>	50%	50%	87%
<i>HeLa</i> <sup>2</sup>	11%	92%	93%
CHO <sup>1</sup>	29%	91%	91%
HPA <sup>3</sup>	63%	79%	95%

<sup>1</sup> (Uhlmann et al., 2016)

<sup>2</sup> (Chebira et al., 2007)

<sup>3</sup> (Coelho et al., 2013)

Merci pour votre  
attention