

Traitement d'images appliqué à la mesure de temps de vie de fluorescence sur des structures mobiles dans les cellules biologiques

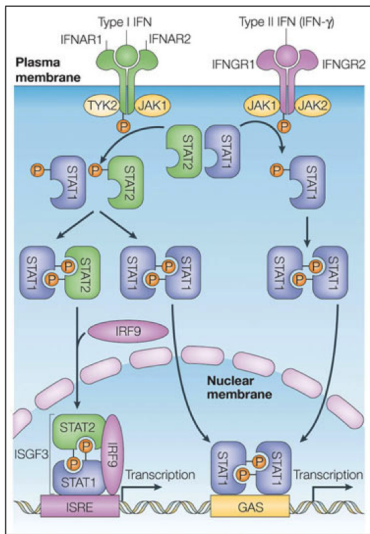
P. Roudot¹, C. Kervrann¹, J. Boulanger², **F. Waharte**²

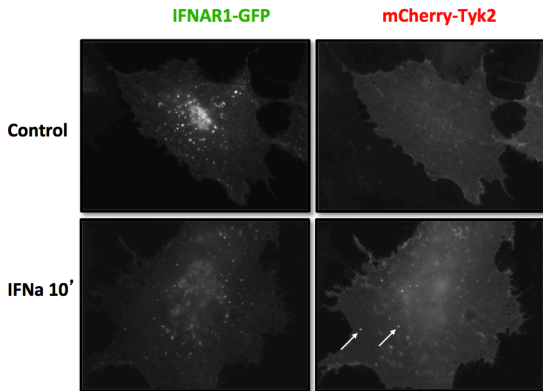
¹INRIA Rennes – Bretagne Atlantique, Campus de Beaulieu, Rennes

²UMR 144 CNRS - PICT IBiSA - Institut Curie, Paris

Lyon, 12 Décembre 2012

Contexte biologique et motivation





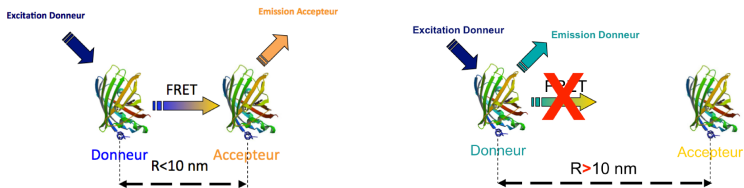
Cédric Blouin (UMR144, Institut Curie)

Proximité moléculaire entre IFNAR1-GFP et tyk2-mCherry sur les vésicules ?

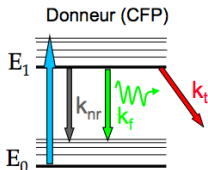
Suivi pendant l'endocytose de cette "interaction" ?
(dynamique spatio-temporelle)

Utilisation du temps de vie (FLIM) pour la mesure de FRET

Principe du FRET (Förster Resonant Energy Transfer)

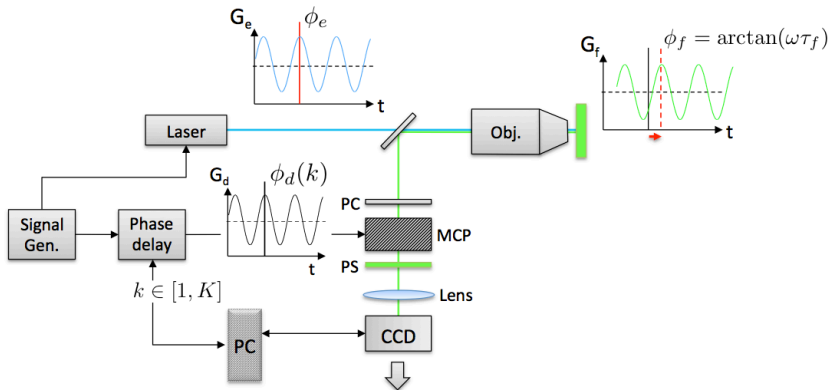


Effet sur le temps de vie de fluorescence



$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_t}$$

Methode de mesure par modulation de phase

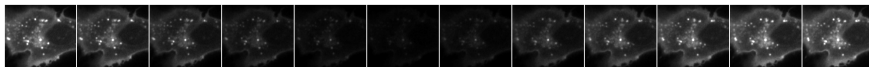


$$S_\theta(k) \propto \int G_f G_d(k) dt$$

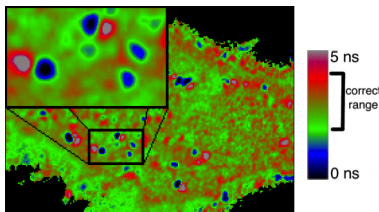
$$S_\theta(k) = C_S + A_S \cos\left(\frac{2\pi k}{K} + \phi_f\right)$$

Détermination de la carte spatiale de temps de vie

Séquence d'acquisition des images à différents décalage de phase :

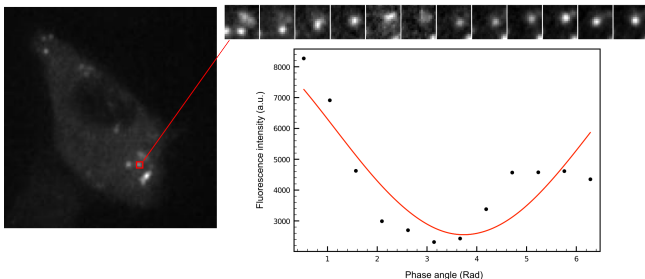


Construction de la carte de temps de vie :



⇒ Effet "Doppler" sur l'estimation du temps de vie

Mouvement des vésicules pendant l'acquisition :



Solutions possibles :

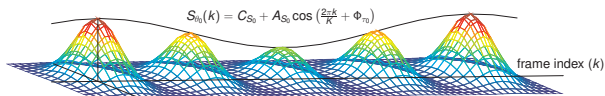
- acquisitions plus rapide (si **signal suffisant** et dans les limites de l'instrument),
- analyse par régions centrées sur les structures (**choix des régions, résolution spatiale**),
- suivi des vésicules et estimation du temps de vie.

Suivi du mouvement des vésicules

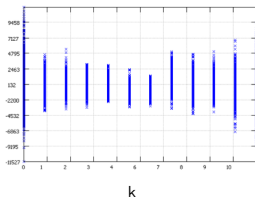
Modèle de variation spatiale et temporelle d'intensité des vésicules dans l'image de phase k à la position x :

$$I(k)(x) = S_{\theta_b}(k)(x) + S_{\theta_0}(k)G_\gamma(x - x_0(k)) + \varepsilon(k)(x)$$

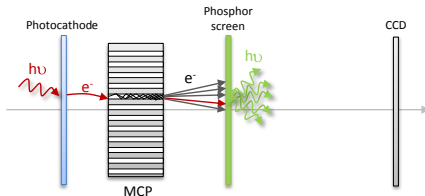
où $S_{\theta_0}(k)$ est l'intensité max du spot qui suit un modèle de variation sinusoidal :



Le bruit $\varepsilon(k)(x)$ dépend donc de k (signal hétéroscédastique) et conduit à des erreurs d'estimation du temps de vie.



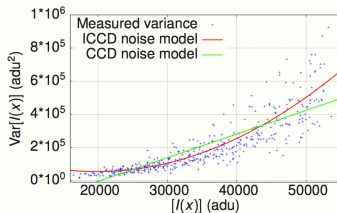
Caractérisation du bruit de mesure



Modèle de bruit de la caméra CCD intensifiée :

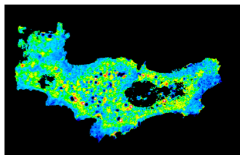
$$I(x) = g_{\text{INT}} g_{\text{CCD}} \mathcal{N}(x) + \xi$$

Le gain de l'intensificateur n'est pas constant mais peut-être modélisé :

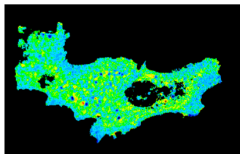


Estimation du temps de vie sur échantillon fixé

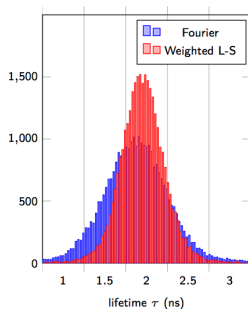
Utilisation du modèle de bruit pour l'amélioration de la précision sur l'estimation du temps de vie dans le cytosol :



Lifetime map using Fourier analysis.



Lifetime map using weighted least-square analysis.

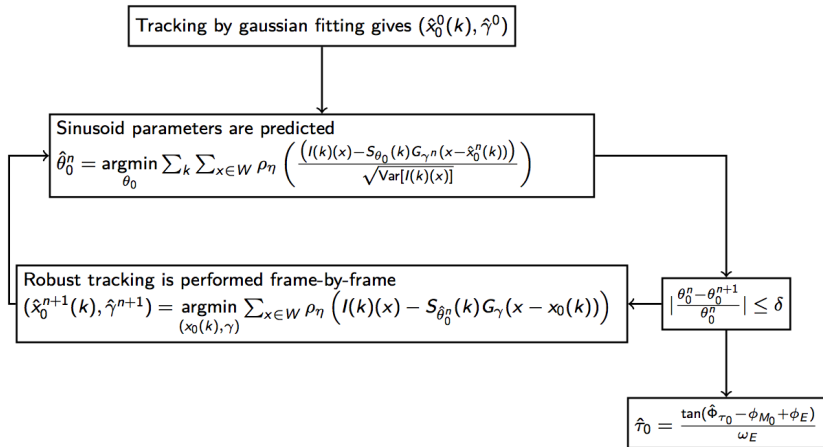


► $T_{\text{Fourier}} \sim \mathcal{N}(2.12, 0.48)$

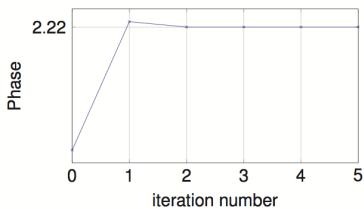
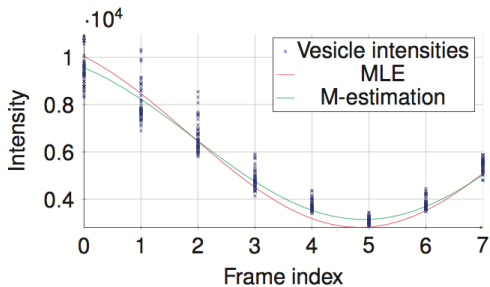
► $T_{\text{WLS}} \sim \mathcal{N}(2.18, 0.28)$

Important pour l'analyse spatio-temporelle de la proximité moléculaire par FRET (différence de temps de vie vésicule/cytosol).

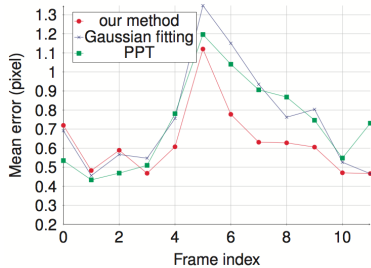
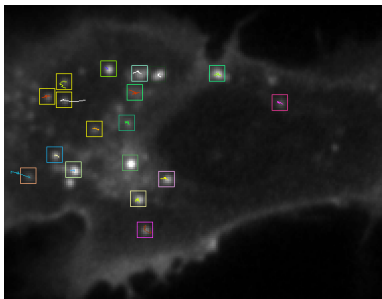
Estimation robuste conjointe du mouvement et du temps de vie



Estimation robuste conjointe du mouvement et du temps de vie

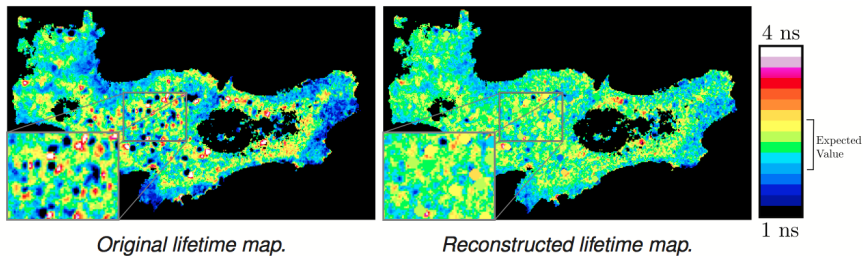


Résultats du suivi robuste des particules

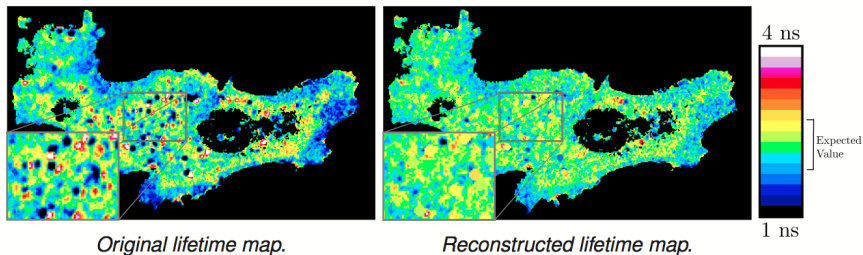


Trouver les N différences !

Trouver les N différences !



Trouver les N différences !



Notre méthode de nano-coloriage permet d'améliorer la précision dans la détermination du temps de vie et donc du FRET, sur un échantillon dynamique donc une analyse spatio-temporelle de la proximité moléculaire.

Il nous reste (entre autres !) à :

- amélioration de la reconstruction du "fond" (remplissage),
- application à l'analyse spatio-temporelle des interactions entre IFNAR1-GFP et Tyk2-mCherry.
- améliorer le suivi de vésicules (disparitions, croisements...),
- traiter le cas de structures déformables (recalage élastique, flot optique...).