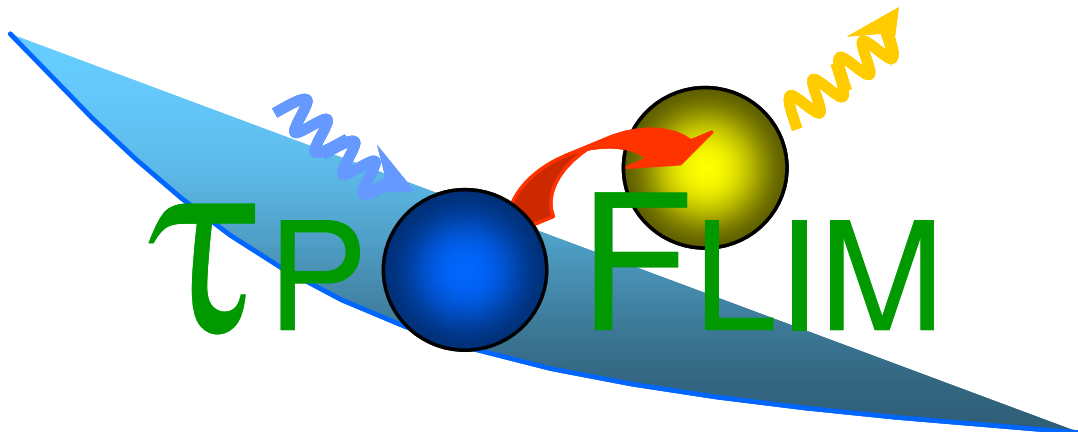


TAUPOGRAPHIE-FLIM Software



VERSION 3.1

Auteurs : Christian Brière, Fabien Esteveny et Alain Jauneau

Contacts : briere@lrsv.ups-tlse.fr ; jauneau@lrsv.ups-tlse.fr

imageriefraib@lrsv.ups-tlse.fr

2017/03/01

Inter Deposit Digital Number

Certificat délivré par

Agence pour la Protection des Programmes

54 rue de Paradis - 75010 PARIS - FRANCE / T. +33(0)1 40 35 03 03 / F. +33(0)1 40 38 96 43

IDDN.FR.001.420023.000.S.P.2016.000.21000
(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10)

Pour l'œuvre : **TAU POGRAHIE version 3.1 en date du 28 novembre 2014**

Identité des titulaires de droits* :

**UNIVERSITÉ PAUL SABATIER
TOULOUSE III**

118 route de Narbonne

31062 TOULOUSE CEDEX 9

FRANCE

Siren : 193113842

**CNRS - CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

3 rue Michel-Ange

75794 PARIS CEDEX 16

FRANCE

Siren : 180089013



Adhérent sous le numéro : **05.31.10561**

Support utilisé : 1 clé USB en double exemplaire

Fait à Paris, le 10/10/2016

Logibox conservée par l'adhérent : 112784
Logibox conservée par l'APP : 112785



(1) Inter Deposit Digital Number
(2) Nationalité de l'œuvre

(3) Numéro de l'organisme d'enregistrement
(4) Numéro d'ordre de l'enregistrement

(5) Numéro de version
(6) Type d'enregistrement

(7) Type de l'œuvre
(8) Année d'enregistrement

T. +33(0)1 40 35 03 03 / F. +33(0)1 40 38 96 43
(10) Classe de protection
Siren 385 385 844 - APE 999Z

APRASSO.FR

* Le titulaire s'engage à informer l'APP de toute cession ou aliénation, totale ou partielle, de ses droits de propriété intellectuelle.
Seules les inscriptions de type S et C permettent un éventuel accès au programme source.

Installation du logiciel Taupographie-FLIM

Créer un dossier qui contiendra le logiciel, par ex. C:\Program Files\Flim
Recopier dans ce dossier le contenu de l'archive flim_install.zip
Créer un raccourci sur le bureau vers le fichier exécutable

Le logiciel utilise les bibliothèques (obligatoires) et fichiers suivants :

Flim.exe	Application
QtCore4.dll	Bibliothèque Qt
QtGui4.dll	Bibliothèque Qt
qwt.dll	Bibliothèque graphiques sous Qt
cminpack.dll	Bibliothèque de calcul : Algorithme de Levenberg-Marquardt
libtiff	Bibliothèque de lecture/écriture de fichiers image au format TIF
flim.ini*	Spécifie les paramètres de convergence pour l'algorithme de Levenberg-Marquardt utilisé dans la méthode des moindres carrés
flimcolortable.txt*	définit la table de pseudo-couleurs (3x8 bits) pour l'affichage des intensités et de la taumap

* si ces fichiers sont absents le logiciel utilise des valeurs par défaut.

NB : Flim.ini est recherché dans « documents » ; flimcolortable.txt est recherché dans « documents » puis dans le dossier contenant le programme.

Contenu par défaut du fichier Flim.ini

1.0e-3	erreur relative sur la somme des carrés (ftol)
1.0e-3	erreur relative sur X (xtol)
1.0e-3	erreur relative sur le gradient (gtol)
400	Nb max d'évaluations de la fonction dans une itération (maxfev)
1.0e-3	Erreur relative sur la fonction (epsfcn)

Si ce fichier est présent dans le dossier "Mes Documents" les valeurs par défaut des paramètres sont remplacées par les valeurs lues dans ce fichier.

NB : la méthode du maximum de vraisemblance utilise l'algorithme du gradient-conjugué (bibliothèque GSL). Les paramètres de convergence sont fixes (ftol=0.001, xtol=0.01, gtol=0.001, maxiter=100)

Table de couleurs :

En l'absence du fichier flimcolortable.txt dans le dossier "Mes Documents" ou dans le dossier du programme une échelle de nuances de gris est utilisée.

Présentation du logiciel Taupographie-FLIM

Le logiciel τ poFLIM permet d'analyser des données de décroissance de fluorescence obtenues à l'aide du système STREAK-FLIM de la société Hamamatsu (fichiers de format NAF), ou bien à l'aide d'un autre système à condition que ces données soient stockées sous la forme d'une pile d'images XxT au format TIF (la version actuelle ne permet pas de lire des fichiers multi-TIF). Il est aussi possible d'importer des valeurs de décroissance sauvegardées dans un fichier texte.

A partir de la version 2.0, dans le cas d'un fichier NAF contenant des données de « time-lapse », c'est-à-dire une pile d'images XxTxY, il est possible d'analyser les données temps par temps.

Dans la version 3 il est possible de gérer plusieurs ensembles de données (fichiers NAF ou fichiers TXT).

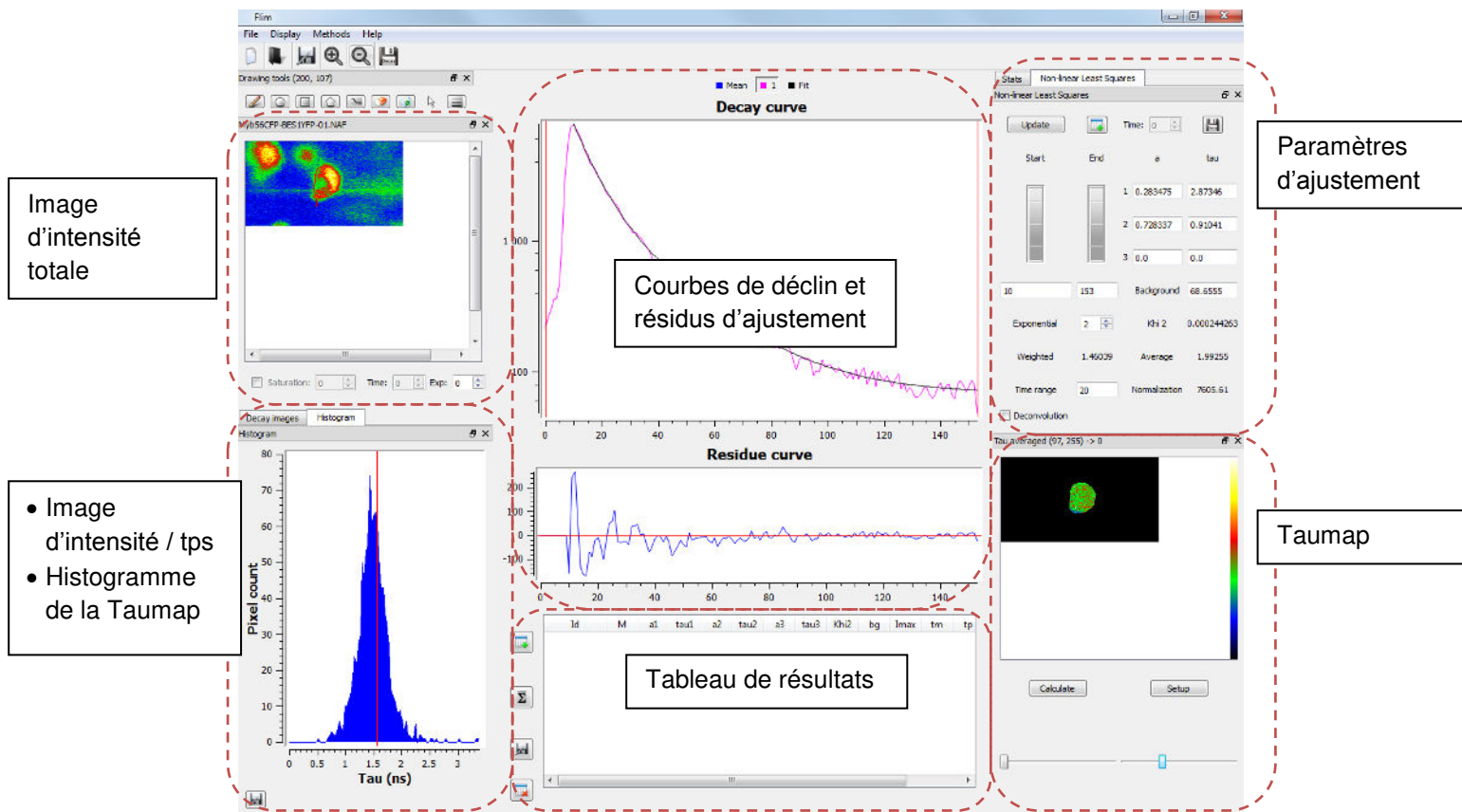
L'analyse peut porter soit sur les courbes de décroissance moyennes de zone sélectionnées (ROI) dans l'objet, soit sur l'ensemble des points d'une ou plusieurs ROIs (analyse au niveau du pixel = calcul d'une « taumap »).

L'ajustement des courbes de décroissance à un modèle multi-exponentiel (d'ordre 1, 2 ou 3) peut-être réalisé à l'aide de différentes méthodes : estimation linéaire ou régression log-linéaire (pour une mono-exponentielle uniquement), moindres carrés non linéaires, ou maximum de vraisemblance (pour une distribution de Poisson)

Les courbes de décroissance peuvent être sauvegardées pour analyse ultérieure. Les valeurs des paramètres calculés peuvent être enregistrées dans un fichier texte (html), ainsi que les courbes de décroissance correspondantes.

Il est enfin possible de sauvegarder les valeurs d'une « taumap » sous la forme d'un fichier image au format TIF (valeurs codées en réels simple précision), et l'histogramme correspondant dans un fichier texte.

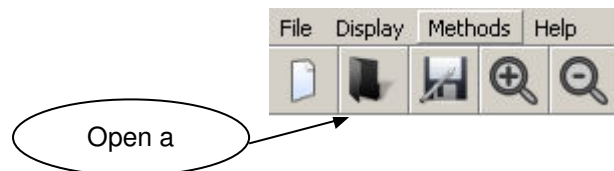
Figure 1 : fenêtre de travail du logiciel FLIM



Prise en main rapide

Charger des données de décroissance

Pour ouvrir un fichier, cliquer sur le menu 'File' puis 'Open' ou bien cliquer sur l'icône correspondant dans la barre d'outils



Ouvrir un fichier au format NAF

Les fichiers .NAF sont des formats spécifiques de données acquises avec les équipements Streak-FLIM de la société Hamamatsu Photonics.

Sélectionner le fichier contenant vos données et cliquez sur « Ouvrir ».

Les données sont alors chargées et l'image d'intensité est affichée. Si le fichier contenait des ROIs, celles-ci sont aussi ajoutées à l'image.

Ouvrir une séquence d'images au format TIFF

Dans le cas d'une séquence de fichiers au format TIFF les noms des fichiers doivent être de la forme « préfixe0n.tif » ou « préfixe00n.tif » suivant le nombre total d'images dans la séquence.

Sélectionnez un des fichiers de la séquence et cliquez sur « ouvrir » pour charger l'ensemble de la séquence.

Après chargement de la séquence d'images, l'image d'intensité est affichée.

Dans le cas d'une séquence d'images au format TIFF il est nécessaire de d'indiquer le « Time range », dans la case prévue à droite de la fenêtre.

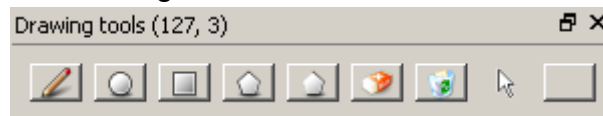
Charger une courbe de décroissance (fichier texte .txt)

Permet de recharger des courbes de décroissance précédemment sauvegardées par ce logiciel ou par le logiciel Hamamatsu.

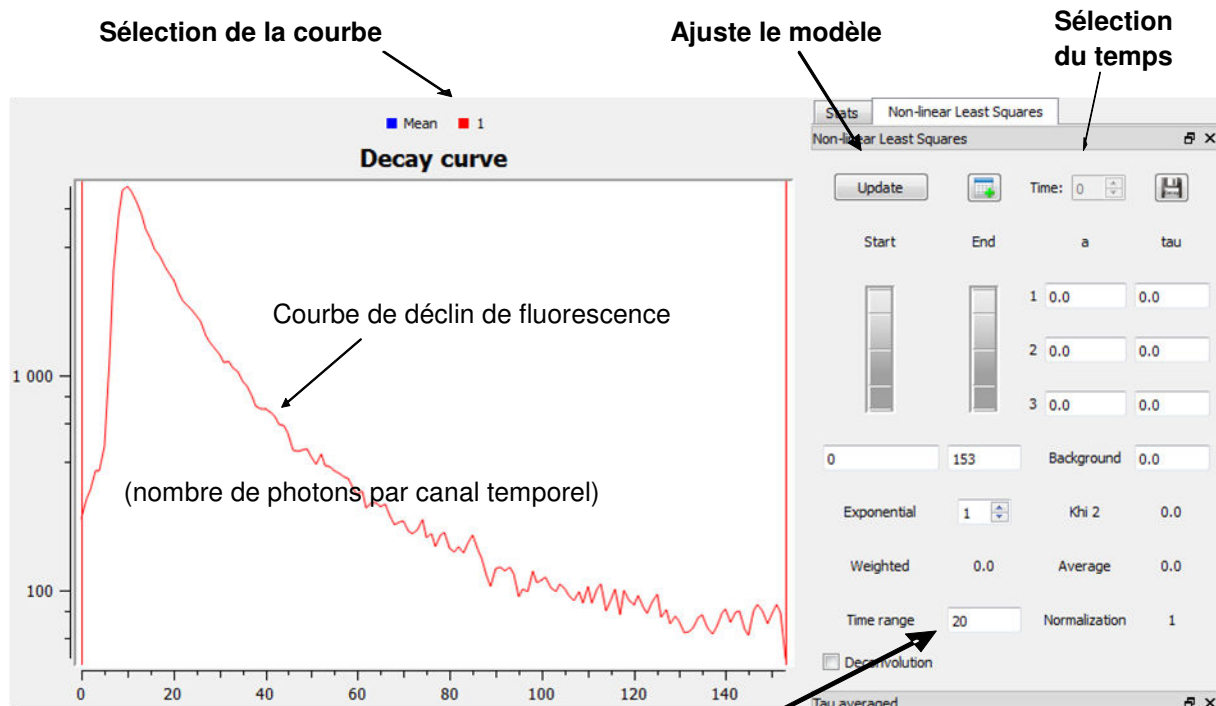
Sélectionnez le fichier texte voulu et cliquer sur ouvrir. Les données de décroissance sont alors chargées et la ou les courbes affichées dans la partie centrale de la fenêtre.

Ajuster une courbe de décroissance

1. Tracez une ROI sur l'image d'intensité à l'aide des boutons situés au dessus



2. Sélectionnez une courbe de décroissance à l'aide des boutons situés au dessus de la fenêtre centrale



Canaux temporels (ici 154 canaux) pour une rampe de 20 ns

3. Sélectionnez l'algorithme de calcul (par défaut : moindres carrés non-linéaires)



4. Choisissez dans la partie droite de la fenêtre le nombre d'exponentielles du modèle d'ajustement choisi, puis cliquez sur le bouton « Update »

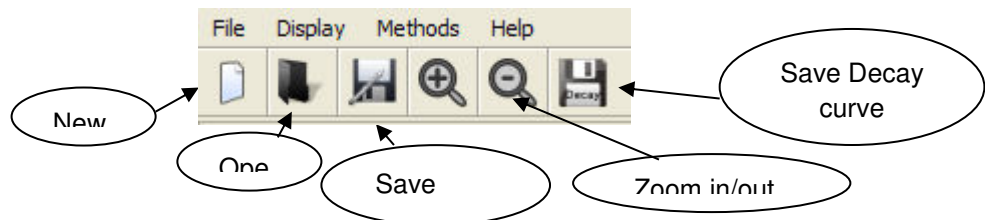
La courbe de décroissance est alors ajustée et les paramètres du modèle s'affichent dans la partie droite de la fenêtre.

NB : les valeurs des coefficients pré-exponentiels sont normalisées par rapport au maximum de la courbe

La fenêtre temporelle d'ajustement peut-être modifiée à l'aide des deux molettes situées dans la partie droite. Par défaut, l'ajustement est réalisé entre le temps correspondant au maximum de la courbe de décroissance, et la fin de la courbe.

Description des divers éléments de la fenêtre principale

Barre d'outils principale :



Menu File :

File>New  : vide le tampon de données et réinitialise tout les paramètres.

File>Open  : ouvre un fichier de données

File>Add : ajoute un nouvel ensemble de données. La valeur 'Exp' sous le panneau de gauche est incrémentée de 1.

File>Save as  : sauvegarde le tableau de résultats

File>Print : impression du tableau de résultats

File>Load Intensity Color table : charge la table de couleurs pour l'affichage des images d'intensité (défaut=niveaux de gris). Fichier de même format que le fichier Flimcolortable.txt

File>Load Taumap Color table : charge la table de couleurs pour l'affichage des images de durée de vie (défaut=niveaux de gris)

File>Save decay curve  : sauvegarde dans un fichier texte les valeurs des courbes de décroissance sélectionnées (avec choix du nom du fichier)

Zoom  : zoom + ou – sur les images d'intensité et sur l'image de durées de vie (Taumap)

Menu Display : affiche/masque les divers éléments de la fenêtre (utile au cas où une fenêtre serait fermée par inadvertance)

Menu Methods : permet de sélectionner l'algorithme de calcul pour réaliser les ajustements

- Linear estimation : méthode RLD (Rapid Lifetime Determination), s'applique uniquement au cas mono-exponentiel
- Log-linear regression : regression linéaire après transformation de données en logarithme (suppose un background égal à 0). Cas mono-exponentiel uniquement.
- Non-linear least squares : choix par défaut. Ajustement au sens des moindres carrés non-linéaires. Utilise l'algorithme de Levenberg-Marquardt (bibliothèque CMINPACK)
- Maximum likelihood : méthode du maximum de vraisemblance. Suppose que le bruit est distribué selon une loi de Poisson. S'applique au cas de données très bruitées (calcul au niveau du pixel). Utilise l'algorithme du gradient conjugué (bibliothèque GSL).
- *Instrumental response : charge une réponse instrumentale mesurée. Fonctionnalité non prise en compte dans cette version.*

Partie gauche : visualisation des données

La partie gauche de la fenêtre permet la visualisation des données d'intensité.
Dans le panneau supérieur s'affiche l'image d'intensité totale, intégrée sur l'ensemble des canaux temporels :

Nom du fichier actif → Image08.NAF

Image d'intensité x,y

$$I(x,y) = \sum_{t=1}^{t_{\max}} I(x,y,t)$$
 (projection des intensités pour tous les canaux temporels)
 La ROI ou les ROIs existantes sont importées.

Réglage de la saturation pour l'affichage → Saturation: 0 Time: 0 Exp: 1

Index de temps dans le cas d'une série temporelle → Time: 0

N° de l'ensemble de données affiché → Exp: 1

Image d'intensité $I(x,y)$ par canal Temporel t →

Curseurs de défilement des Images $I(x,y)$ selon le numéro de canal →

Numéro du canal temporel affiché → 20

Valeur de saturation pour l'affichage de l'image → Saturation: 0

Dans le panneau inférieur, l'onglet « Decay images » affiche les images d'intensité par canal temporel.

L'onglet « Histogram » permet de visualiser l'histogramme de la « taumap » affichée dans le panneau de droite.

Barre d'outils de dessins : définir un ou des ROIs (Region Of Interest)

Vous pouvez créer ou supprimer des ROIs en utilisant les outils de dessin ;



Lorsque ce bouton est activé, le survol avec le pointeur de l'image d'intensité affiche automatiquement la courbe de décroissance associée au pixel survolé. Sélectionner un pixel en cliquant sur l'image et afficher dans la fenêtre 'Decay Curve' la courbe de déclin de fluorescence en fonction du temps.



Ces boutons permettent de dessiner sur l'image des régions d'intérêt (ROIs) de forme sphérique, rectangulaire ou polygonale. De même que précédemment, une courbe est affichée dans la fenêtre 'Decay Curve'. Chaque point de la courbe correspond à l'intensité moyenne (somme des intensités des pixels inclus dans la ROI divisée par le nombre de pixels de la ROI) en fonction du temps.



Ce bouton permet de tracer une ligne comme ROI (cet outil est précieux afin de sélectionner les pixels le long de structures +/- linéaire comme les membranes).

L'épaisseur (en pixels) de cette ligne est ajustable en cliquant sur le bouton



supprime la ROI sélectionnée



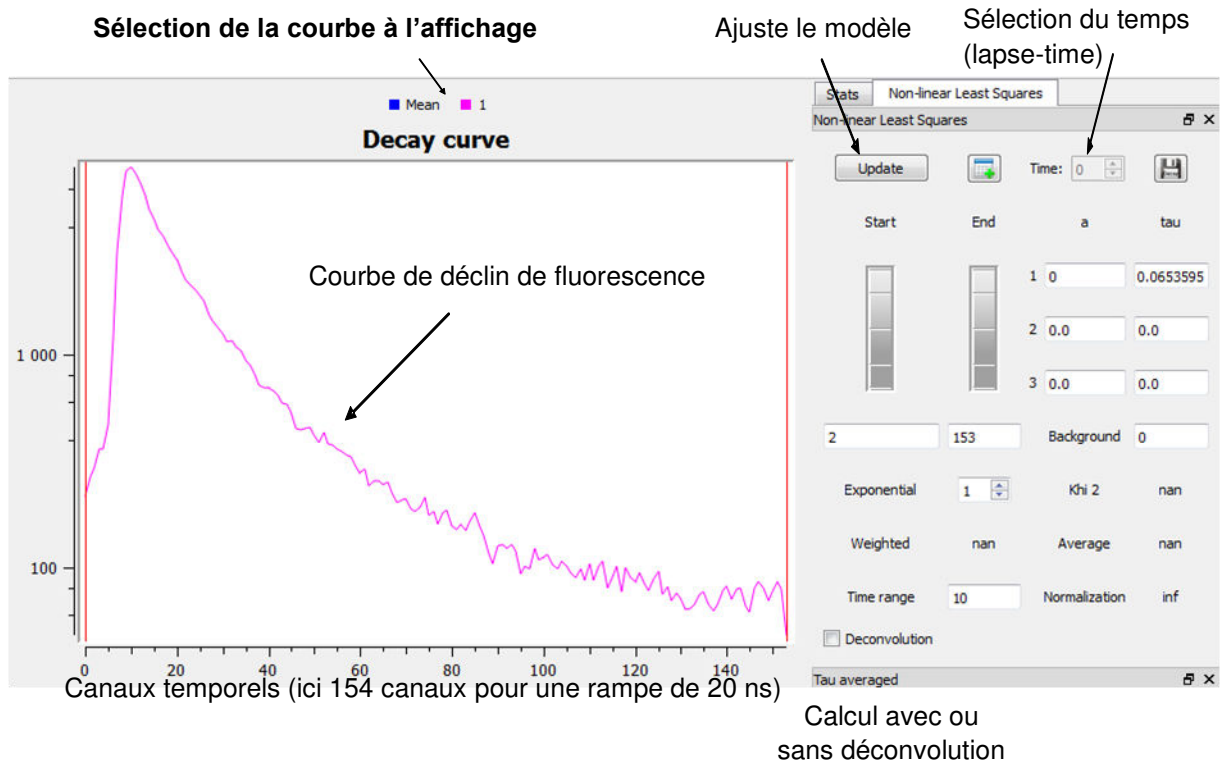
supprime toutes les ROIs.

La flèche  active le mode sélection des ROIs



ce bouton permet de choisir l'épaisseur du trait pour la sélection d'une ligne

Zone centrale : affichage des courbes de décroissance et des paramètres (modèle mono- ou multi-exponentiel)

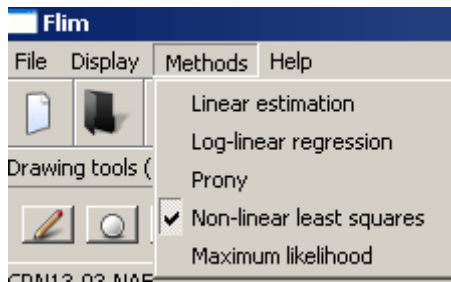


La courbe de déclin de fluorescence $I = f(t)$ s'affiche automatiquement pour chaque ROI. L'échelle des abscisses représente les numéros de canaux temporels et l'échelle des ordonnées (logarithmique) représente les intensités (en nombre de coups). Les valeurs de I pour chaque canal temporel correspondent à la moyenne des valeurs de I pour les pixels inclus dans la ROI. Vous pouvez afficher plusieurs courbes par image ouverte, chaque courbe correspondant à des ROIs différentes.

La courbe « Mean » affiche par défaut la courbe moyenne de déclin calculée sur toute l'image. Elle est aussi utilisée pour afficher la courbe moyenne des courbes stockées dans le tableau de résultat (voir le § Sauvegarde des données et des résultats).

Les courbes sélectionnées (en cliquant sur leur numéro dans la légende) peuvent être supprimées par appui sur la touche de clavier « Delete » ou « Suppr ». dans ce cas les ROIs correspondantes sont aussi supprimées.

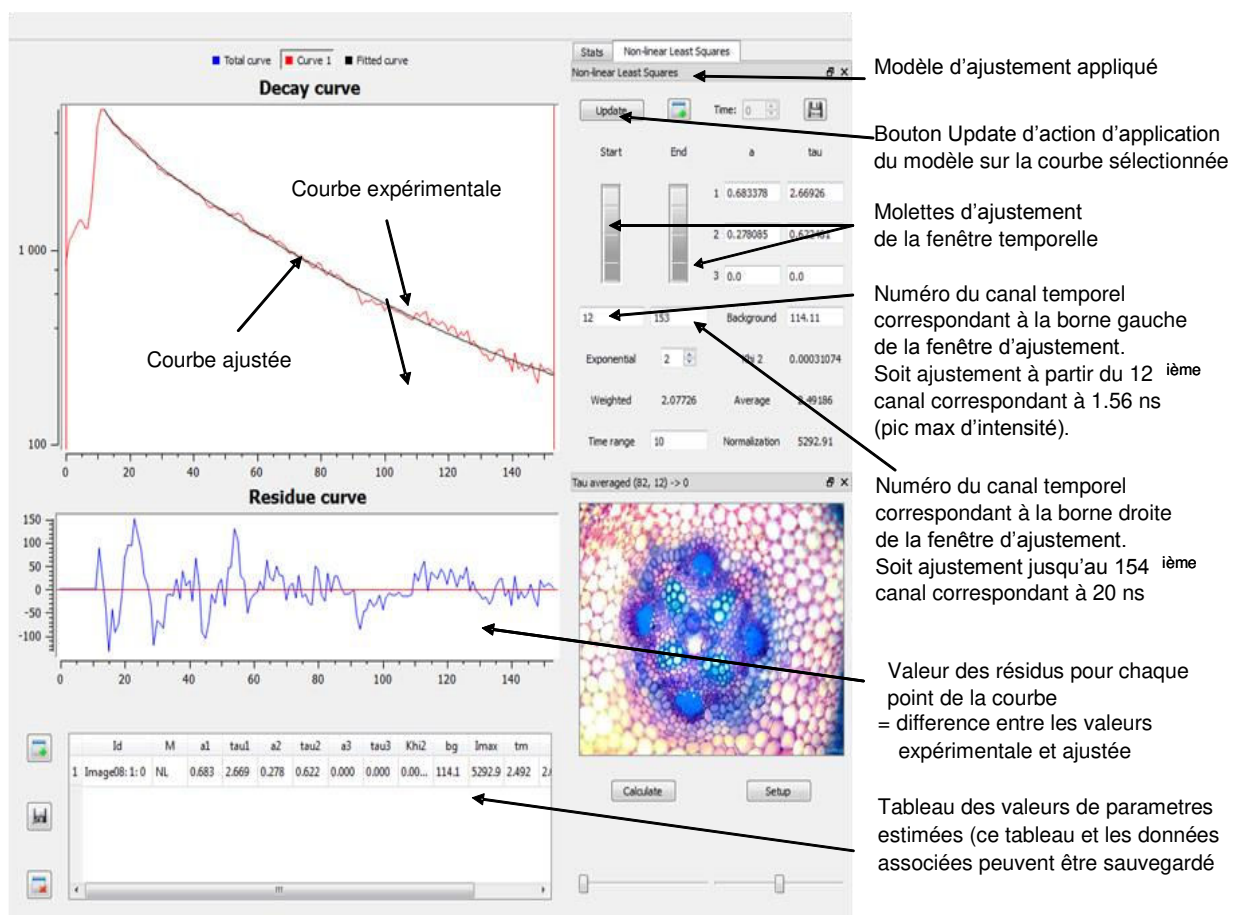
Sur la partie droite, en cliquant sur le bouton Update, la sélection est ajustée à un modèle mono- ou multi-exponentiel selon la méthode choisie dans le menu 'Méthodes' (par défaut la méthode appliquée est une méthode d'ajustement non linéaire au sens des moindres carrés pondérés).



La méthode des moindres carrés est bien adaptée au cas de données bruitées par une variable suivant une distribution normale, ce qui est approximativement correct lorsque l'on ajuste des courbes de décroissance moyennes sur une ROI.

Dans l'exemple donné ci-dessous, le type d'ajustement est du deuxième ordre (exponentielle décroissante de 2^{ème} ordre) :

$$I = \alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2} + y_0$$



Le modèle est ajusté aux données brutes, non normalisées. Par contre les coefficients pré-exponentiels affichés dans la fenêtre de droite sont normalisés par rapport à la valeur maximale de la courbe (affichée dans la case Normalisation,

en bas à droite du panneau), et représentent donc approximativement la part de chaque terme exponentiel dans le modèle final

Dans le cas d'un ajustement au sens des moindres carrés ou par maximum de vraisemblance, il est possible de fixer la valeur d'un ou plusieurs paramètres (y_0 , a_i , τ_{τ_i}) :

- entrer la valeur souhaitée dans la case correspondante
- double-cliquer sur cette case (la case devient alors rouge)

Dans le cas d'une série temporelle l'incrémentation de l'index de temps à l'aide du

bouton  entraîne une mise à jour automatique des courbes de décroissance et de l'ajustement du modèle en cours.

Déconvolution :

Par défaut les calculs sont effectués sans déconvolution des données mesurées. La case à cocher en bas à gauche du panneau Paramètres permet d'activer le calcul avec déconvolution.

La méthode implémentée n'utilise pas une réponse instrumentale mesurée préalablement mais est basée sur un modèle gaussien de réponse instrumentale. Lorsqu'elle est activée la déconvolution est aussi appliquée lors du calcul de la Taumap.

NB : le calcul avec déconvolution n'est applicable que lorsque l'on sélectionne la méthode des moindres carrés.

Zone centrale et panneau droit de la fenêtre : résultats des ajustements :

Les résultats sont affichés dans le panneau paramètre.

Les coefficients pre-exponentiels sont normalisés (après estimation) par rapport à la valeur maximale observée, de sorte que leur somme être proche de 1 (la signification de 'a' est : la composante d'une durée de vie τ_1 contribue à $100\alpha_1$ % de l'intensité I, et la composante d'une durée de vie τ_2 contribue à $100\alpha_2$ % de l'intensité totale I).

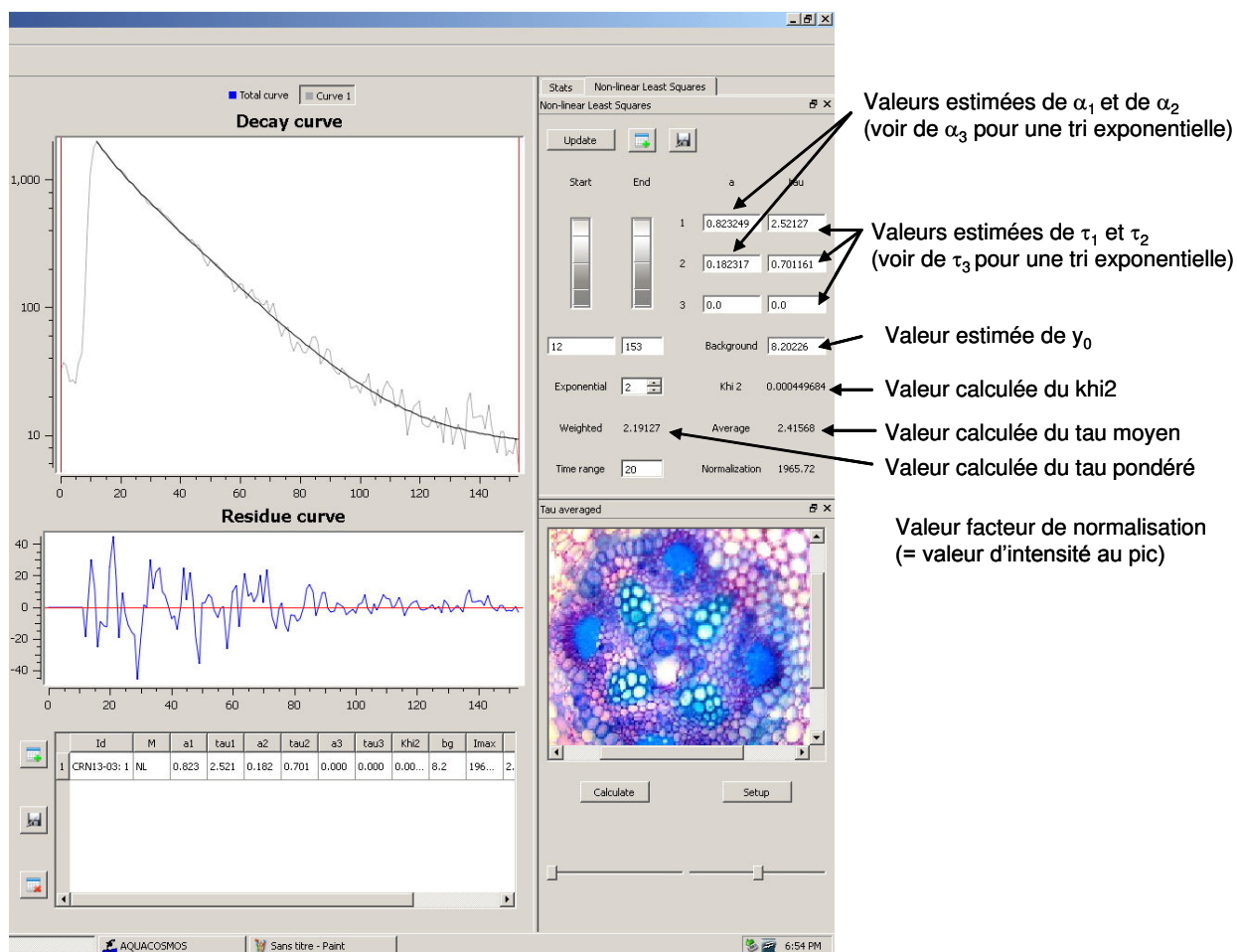
La valeur calculée de la durée moyenne de vie à l'état excité, tau moyen (τ_m) est donnée par :

$$\tau_m = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i}$$

Et la valeur du tau pondéré (τ_p), est donnée par :

$$\tau_p = \frac{\sum \alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i}$$

La valeur de normalisation des coefficients pre-exponentiels est égale à l'intensité au pic (I_{max})



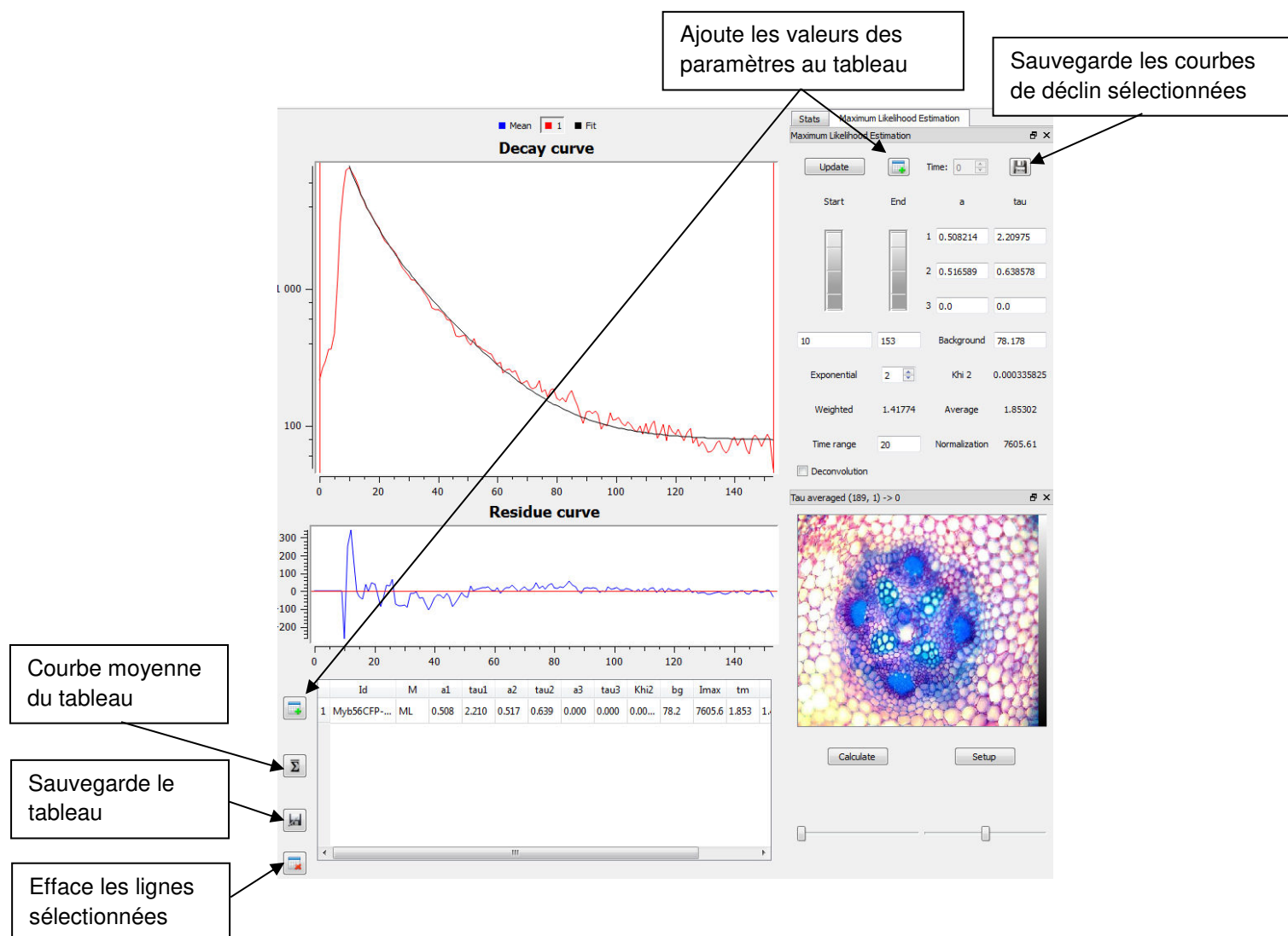
La valeur de khi² correspond à la somme des carrés des écarts entre les valeurs expérimentales et les valeurs ajustées (autrement dit somme des carrés des résidus affichés dans la fenêtre « Residue curve ») divisée par le nombre n de canaux temporels :

$$khi^2 = \frac{\sum (I_{mesurée} - I_{calculée})^2}{n}$$

Une première estimation de la qualité de l'ajustement réalisé porte sur trois critères :

Vérification que : $\sum \alpha_i$ est proche de 1, les résidus sont distribués de part et d'autre de la courbe expérimentale de déclin, et la valeur khi² est minimisée.

Sauvegarder les données et les résultats :



Ce bouton situé en haut du panneau « paramètres » sauvegarde les courbes de décroissance sélectionnées dans un fichier texte. Il a le même effet que le menu « File>Save Decay Curve » ou que le bouton situé dans la barre d'outils principale, sauf que le nom du fichier est créé automatiquement à partir du nom du fichier de données de décroissance et du numéro des courbes.



Ajoute les valeurs courantes des paramètres au tableau de résultats situé en bas de la partie centrale. Il a le même effet que le même bouton situé à gauche du tableau. A noter que les valeurs des paramètres sont recalculées avant d'être copiées dans le tableau.

Les données du tableau :

	Id	M	a1	tau1	a2	tau2	a3	tau3	Khi2	bg	Imax	
1	CRN13-03: 1	NL	0.823	2.521	0.182	0.701	0.000	0.000	0.00...	8.2	196...	2.

Dans ce tableau, sont sauvegardées les données suivantes :

- Id : le nom du fichier (ex : CRN13-03) ainsi que le numéro de la ROI (ex : 1)
- M : le modèle d'ajustement utilisé (ex : NL pour non linear least squares, ML pour maximum likelihood)
- a1, tau1 ; a2 ; tau2..., khi2, bg et Imax. : correspondent aux paramètres estimés, à la valeur du Khi2, au background et à la valeur de normalisation.
- tm et tp : correspondent respectivement à la valeur de tau moyen et de tau pondéré

$$\tau_m = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad \tau_p = \frac{\sum \alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i}$$

- t0 : canal temporel de début d'ajustement (correspondant par défaut au canal temporel pour lequel I est maximum);
- t1 : canal temporel de fin d'ajustement

NB : ces deux valeurs sont celles visibles dans les cases situées sous les molettes d'ajustement de la fenêtre.



Sauvegarde les données du tableau dans un fichier .html. En même temps, sauvegarde les données des courbes correspondantes dans un fichier texte de même préfixe et de suffixe « _data.txt »



Calcule la courbe moyenne des courbes sauvegardées dans le tableau et affiche cette courbe à la place de la courbe « Mean ». Il est ensuite possible d'ajuster et/ou sauvegarder cette courbe comme n'importe quelle autre.



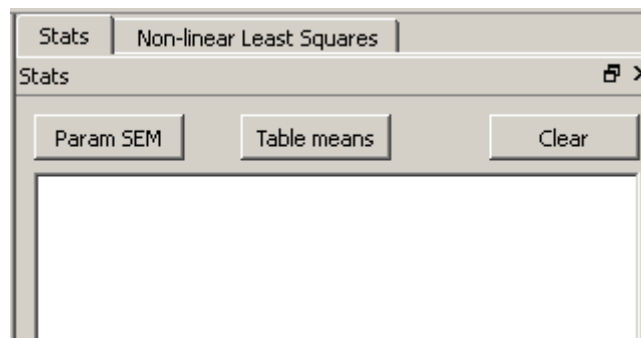
Ce bouton assure deux fonctions : il permet de supprimer une ligne préalablement sélectionnée, ou si aucune ligne n'est sélectionnée, il supprime l'ensemble du tableau.

NB : Lors de l'analyse d'une nouvelle série d'images, il est impératif d'effacer (de

réinitialiser) l'ensemble des fonctions en cliquant sur l'icône « New »  située en haut à gauche de la barre d'outils ou de cliquer sur « File » et dans le menu de choisir « New ».

Estimation de la qualité d'un ajustement :

Un ajustement étant réalisé, cliquer sur l'onglet « Stats » du panneau « paramètres ».



Les fonctions de cette fenêtre permettent d'accéder à des données statistiques des estimations des différents paramètres.

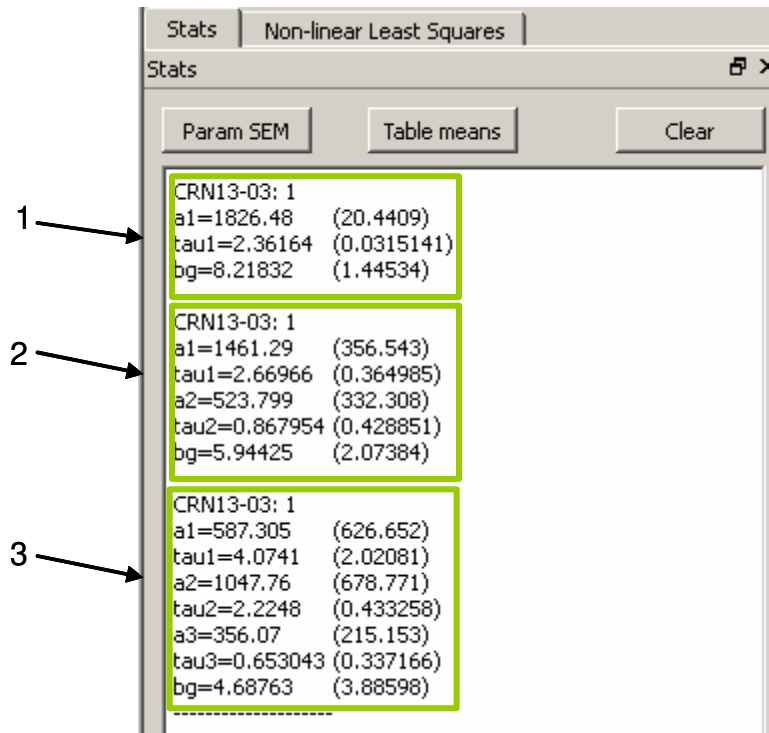
NB : Les données affichées dans cette fenêtre peuvent être sélectionnées et copiées (CTL-C) puis collées dans un document Word ou autre texte.

Bouton « Param SEM »

Permet d'obtenir une estimation de l'écart type pour les différents paramètres d'ajustement d'une courbe, par la méthode de type bootstrap suivante :

1. La courbe est ajustée et les résidus pondérés sont calculés, puis
2. les résidus sont permutés aléatoirement, une nouvelle courbe de décroissance est ensuite calculée et ajustée

Cette opération est répétée 30 fois, puis les valeurs moyennes et les écarts-types des paramètres estimés sont calculés



Les valeurs suivantes sont alors affichées :

Nom du fichier : numéro de courbe

Valeur moyenne des paramètres α , τ et bg (y_0).

Entre parenthèse la valeur des écarts-types correspondants.

NB : les valeurs des coefficients pre-exponentiels affichées dans cette fenêtre ne sont pas normalisées.

Cette fonctionnalité permet d'opter pour le meilleur ajustement minimisant les écarts types. Par exemple :

- dans le cadre du haut (suite à l'ajustement d'une mono exponentielle), la valeur moyenne de tau1 est de 2.36 avec un écart-type de 0.031 ns soit un coefficient de variation de 1,3 % (CV = écart type / moyenne).

- dans le cadre du milieu (suite à l'ajustement d'une bi exponentielle), la valeur moyenne de tau2 est de 2.67 avec un écart-type de 0.36 ns soit un coefficient de variation de 13,6 % (CV = écart type / moyenne).

etc....et pour tout les paramètres.

Ces valeurs d'écart type ou de CV sont à comparer avec celles obtenues sur un échantillon d'une population (autrement dit n mesures sur des objets du même type,

dans l'exemple fourni des cellules de type CRN5-GFP). Plus les valeurs de l'écart type et du CV de n estimations d'un objet sont proches des valeurs de l'écart type et CV des estimations de n objets, plus grande est la qualité des estimations faites.

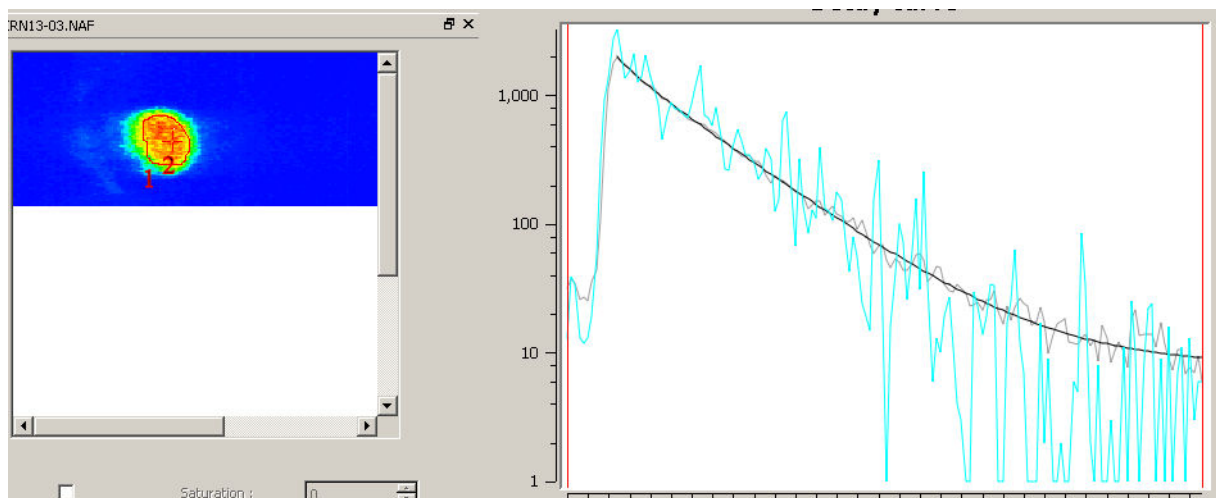
Bouton « Table Means »

Comme son nom l'indique ce bouton permet d'afficher les valeurs moyennes et écarts-types des données stockées dans le tableau de résultat.

Bouton Clear : efface la fenêtre

Réaliser une cartographie de la durée de vie.

La problématique n'est plus de donner une durée de vie moyenne au sein de l'objet (ou d'une ROI) mais d'établir une cartographie de la durée au sein de l'objet. Cela revient à déterminer la durée de vie au niveau de chaque pixel et donc de faire autant d'ajustements qu'il y a de pixels dans l'image.



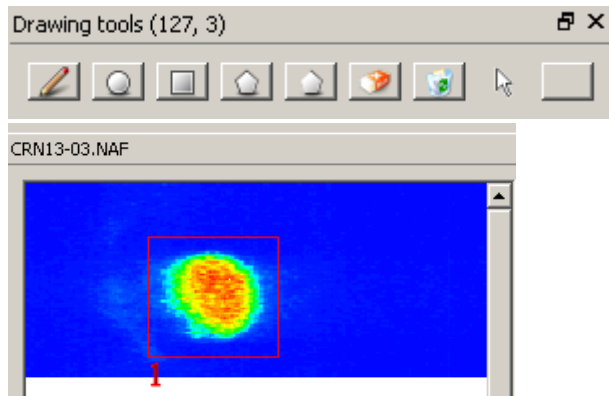
Dans l'exemple ci-dessus (fichier image CRN13-03.Naf), la courbes grise correspond comme précédemment à la courbe expérimentale de déclin (moyenne des courbes unitaires des pixels contenus dans la ROI polygonale, notée 1 sur l'image) et la courbe noire à la courbe ajustée.

La courbe en bleu montre un exemple de déclin mesuré au niveau d'un seul pixel repéré par la croix sur l'image (il y a donc autant de courbes individuelles que de pixels).

Procédure

Dans la fenêtre d'affichage de l'image, supprimer éventuellement la ou les ROIs

présentes (cliquer sur l'icône  ; puis dessiner une ROI autour de la zone d'intérêt afin de réduire le nombre de pixels (donc de courbes à ajuster).



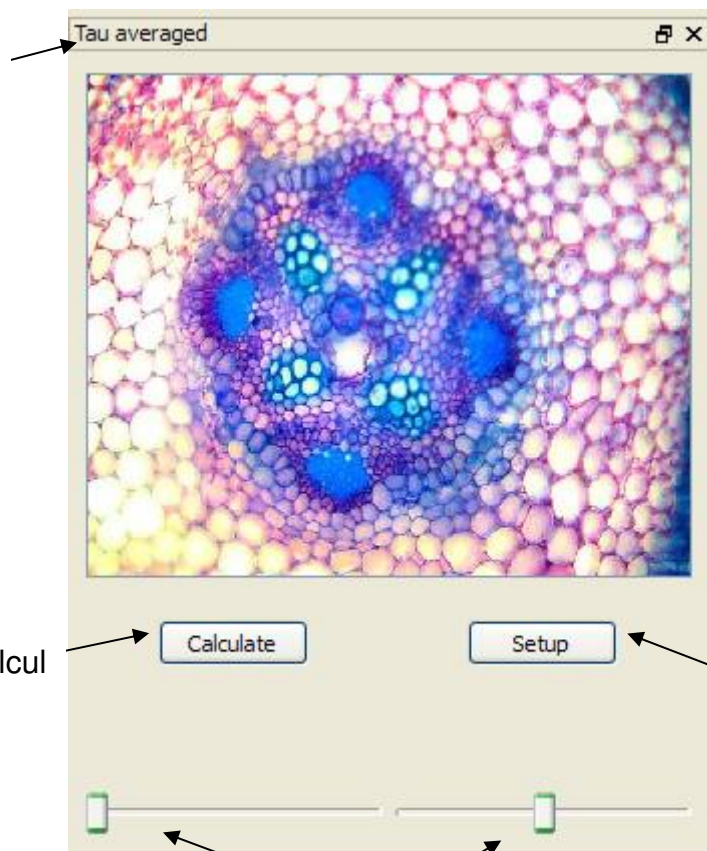
Le réglages des paramètres pour le calcul et le lancement du calcul sont réalisés dans la fenêtre « Taumap » ci-dessous :

Paramètre représenté

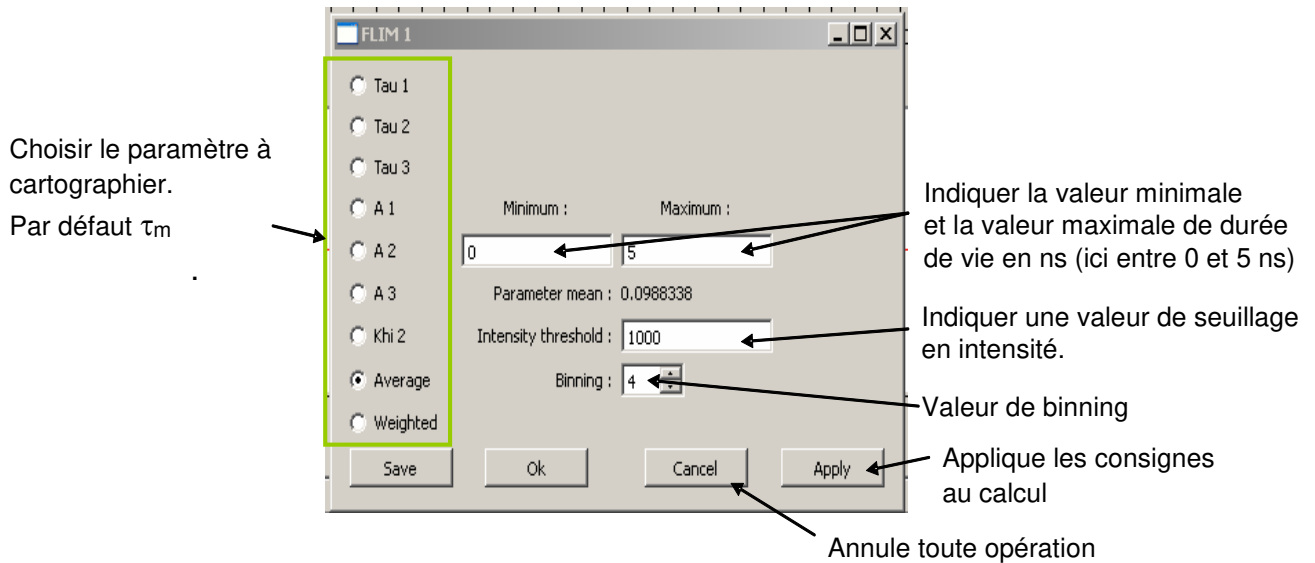
Exécute le calcul de la taumap

Ouvre la fenêtre de paramétrage

Réglettes Min et Max pour l'affichage

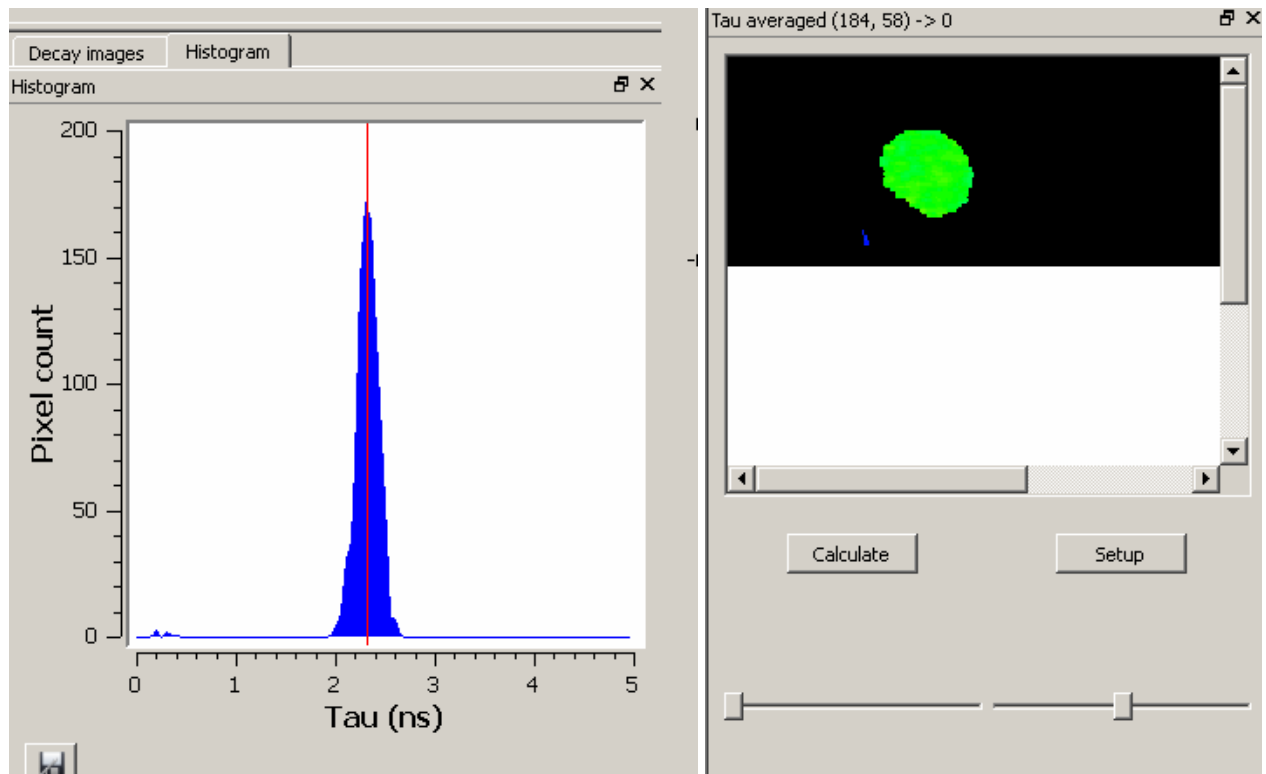


Afin de paramétrer le calcul, cliquer sur le bouton Setup situé en bas à droite de la fenêtre « taumap » pour ouvrir la fenêtre de paramétrage (intitulée FLIM1) :



- La cartographie des différents paramètres indiqués sur la partie gauche peut être réalisée (cocher la case correspondante dans la liste).
- Dans la case « Intensity Threshold »: indiquer la valeur de seuillage en intensité. Les pixels dont l'intensité au pic est inférieure à cette valeur ne seront pas ajustés (et mis à 0 sur l'image de cartographie). Cela constitue un gain de temps de calcul.
- La case « Binning » permet de choisir une valeur de moyennée des pixels pour le calcul, en les regroupant par 2x2, 3x3, 4x4, ... Cela permet d'éviter, en partie, les valeurs aberrantes et de diminuer un peu le temps de calcul.
- Les cases « Minimum » et « Maximum » définissent les valeurs min et max du paramètre calculé à utiliser pour l'affichage. Elles correspondent aux deux réglettes Minimum et Maximum situées en bas de la fenêtre « taumap » et déterminent l'échelle des couleurs. Ces valeurs sont ajustables a posteriori soit en rentrant des valeurs dans ces fenêtres, soit en manipulant les deux curseurs.

Le résultat se présente sous deux formes : d'une part une image de la cartographie du paramètre sélectionné (τ_m dans l'exemple ci-dessous) et d'autre part un histogramme (dans la fenêtre de gauche) représentant la distribution des valeurs du paramètre au sein de l'image ou de la ou les zone(s) sélectionnée(s).



Sauvegarde des données calculées :

- Image de cartographie : ouvrir la fenêtre « Setup » et cliquer sur « Save ». L'image est sauvée au format TIFF en données réelles double-précision.
- Histogramme : cliquer sur le bouton en bas à gauche de la fenêtre. Les valeurs de l'histogramme sont sauvegardées dans un fichier texte.

Rappels : Méthodes non-linéaires d'estimation des paramètres d'un modèle

Le modèle théorique est une famille de fonctions $f(t; \theta)$ d'une variable muette t , indexée par un ou plusieurs paramètres θ inconnus. L'objectif est d'obtenir des estimations des valeurs de ces paramètres à partir de données expérimentales, de manière à ce que le modèle théorique représente « au mieux » les valeurs mesurées.

Ajustement par la méthode des moindres carrés.

La méthode des moindres carrés permet de sélectionner parmi ces fonctions, celle qui minimise la somme des carrés des écarts entre les données expérimentales et les valeurs calculées : on parle dans ce cas d'**ajustement par la méthode des moindres carrés**.

La méthode consiste en une prescription (initialement empirique) pré-supposant que la fonction $f(t; \theta)$ qui décrit « le mieux » les données est celle qui minimise la somme quadratique des déviations des mesures aux prédictions de $f(t; \theta)$. Si, par exemple, nous disposons de n mesures $(y_i)_{i=1, \dots, N}$, les paramètres θ « optimaux » au sens de la méthode des moindres carrés sont ceux qui minimisent la quantité :

$$S(\theta) = \sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i; \theta))^2 = \sum_{i=1}^N r_i^2(\theta)$$

où les $r_i(\theta)$ sont les *résidus* au modèle, i.e. les écarts entre les points de mesure y_i et le modèle $f(x; \theta)$. $S(\theta)$ peut être considéré comme une mesure de la *distance* entre les données expérimentales et le modèle théorique qui prédit ces données. [La prescription des moindres carrés commande que cette distance soit minimale.](#)

Si, comme c'est généralement le cas, on dispose d'une estimation de l'écart-type σ_i du bruit qui affecte chaque mesure y_i , on l'utilise pour « pondérer » la contribution de la mesure au χ^2 . Une mesure aura d'autant plus de poids que son incertitude sera faible:

$$\chi^2(\theta) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{y_i - f(x_i; \theta)}{\sigma_i} \right)^2 = \sum_{i=1}^N w_i (y_i - f(x_i; \theta))^2$$

Les quantités w_i , inverses des variances des mesures sont appelés *poids* des mesures. La quantité ci-dessus est appelée **khi carré** ou [khi-deux](#). Son nom vient

de la loi statistique qu'elle décrit, si les erreurs de mesure qui entachent les y_i sont distribuées suivant une Loi normale (ce qui est très courant). Dans ce dernier cas, la méthode des moindres carrés permet de plus d'estimer quantitativement l'adéquation du modèle aux mesures, pour peu que l'on dispose d'une estimation fiable des erreurs σ_i .

Son extrême simplicité fait que cette méthode est très couramment utilisée de nos jours en sciences expérimentales. Une application courante est le *lissage* des données expérimentales par une fonction empirique (fonction linéaire, polynômes ou splines). Cependant son usage le plus important est probablement la mesure de quantités physiques à partir de données expérimentales. Dans de nombreux cas, la quantité que l'on cherche à mesurer n'est pas observable et n'apparaît qu'indirectement comme paramètre θ d'un modèle théorique $f(x; \theta)$. Dans ce dernier cas de figure, il est possible de montrer que la méthode des moindres carrés permet de construire un estimateur de θ , qui vérifie certaines conditions d'optimalité. En particulier, lorsque le modèle $f(x; \theta)$ est linéaire en fonction de θ , le théorème de Gauss-Markov garantit que la méthode des moindres carrés permet d'obtenir l'estimateur non-biaisé le moins dispersé. Lorsque le modèle est une fonction non-linéaire des paramètres θ l'estimateur est généralement biaisé. Par ailleurs, dans tous les cas, les estimateurs obtenus sont extrêmement sensibles aux points aberrants : on traduit ce fait en disant qu'ils sont non robustes. Plusieurs techniques permettent cependant de **rendre plus robuste** la méthode.

Dans de nombreux cas, la dépendance du modèle en θ est non-linéaire. Par exemple, où $f(x; \theta) = f(x; \tau) = \exp(-x / \tau)$. Dans ce cas, le formalisme décrit à la section précédente ne peut pas être appliqué directement. L'approche généralement employée consiste alors à partir d'une estimation de la solution, à linéariser le χ^2 en ce point, résoudre le problème linéarisé, puis itérer. Cette approche est équivalente à l'algorithme de minimisation de Gauss-Newton. D'autres techniques de minimisation existent. Certaines, comme l'algorithme de Levenberg-Marquardt, sont des raffinements de l'algorithme de Gauss-Newton. D'autres sont applicables lorsque les dérivées du χ^2 sont difficiles ou coûteuses à calculer.

Une des difficultés des problèmes de moindres carrés non-linéaires est l'existence fréquente de plusieurs minima locaux. Une exploration systématique de l'espace des paramètres peut alors se révéler nécessaire

Estimation par la méthode du maximum de vraisemblance.

Si le modèle d'erreur est non gaussien, il faut recourir à la méthode du **maximum de vraisemblance** (dont la méthode des moindres carrés est un cas particulier dans le cas gaussien).

Lorsque l'on considère les données au niveau du pixel le modèle d'erreur suit plutôt une loi de Poisson. Cela signifie que l'intensité observée au niveau d'un pixel à l'instant t suit une loi de Poisson de paramètre $f(t; \theta)$, où θ représente les paramètres du modèle.

La méthode du maximum de vraisemblance consiste à rechercher les valeurs des paramètres θ qui maximisent la fonction de vraisemblance

$$L(\theta) = \prod_i P(y_i; f(t_i, \theta))$$

où $P(y; \lambda) = \frac{\lambda^y}{y!} e^{-\lambda}$ est la densité d'une variable suivant une loi de Poisson de paramètre λ

En pratique, on cherche le maximum du logarithme de la fonction de vraisemblance :

$$\text{Log}(L(\theta)) = \sum_{i=1}^n [y_i \text{Log}(f(t_i, \theta)) - \text{Log}(y_i!) - f(t_i, \theta)]$$

NB : $\text{Log}(y!) \cong \text{Log}(\sqrt{2\pi}) + \text{Log}(\sqrt{y}) + y \text{Log}(\frac{y}{e})$ en appliquant la formule de Stirling

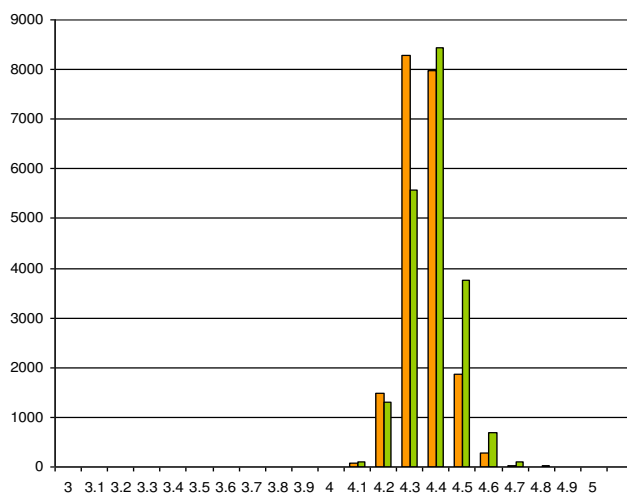
ILLUSTRATION : Comparaison entre NL (Non Linear Least Square) et ML (Maximum Likelihood) sur une solution de fluorescéine (durée de vie de 4.3 ns)

Analyse de la distribution de $N = 20.000$ pixels en fonction de la valeur de tau selon une méthode d'ajustement au moindre carré (**orange**) et au maximum de vraisemblance (**vert**). Les images sont obtenues à partir d'une solution de fluorescéine acquise avec les conditions suivantes MCP3 5 intégrations (Rampe de 20 ns). Dans ces conditions, le maximum au pic est de l'ordre de $3 \cdot 10^3$.

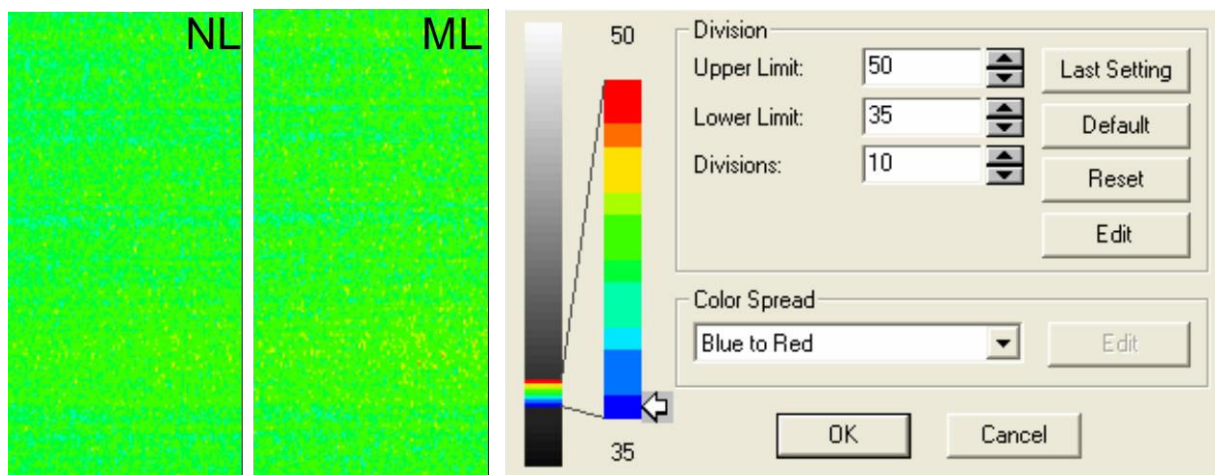
Mean value NL 4.30 +/- 0.079 ns (min = 3.95 ns, max = 4.76)

Mean value ML 4.34 +/- 0.065 ns (min = 3.97 ns, max = 4.84)

Dans les deux cas, on obtient des résultats similaires:



Valeur flottante * 10



Cartographie de tau selon un ajustement au moindre carré (NL), au maximum de vraisemblance (ML)

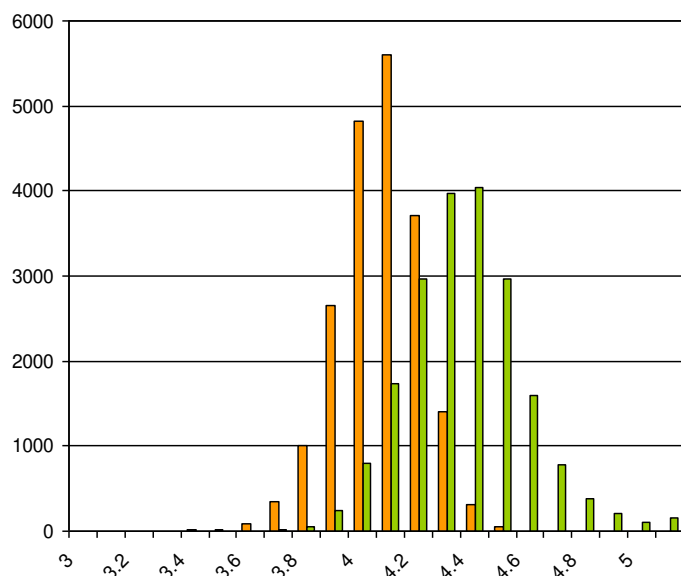
Dans le cas, où la valeur au pic est inférieure, les résultats en cartographie sont dépendants du modèle d'ajustement (voir explication dans les rappels ci-dessus)

Analyse de la distribution des pixels (N = 20.000) en fonction de la valeur de tau selon une méthode d'ajustement au moindre carré (**orange**) et au maximum de vraisemblance (**vert**)

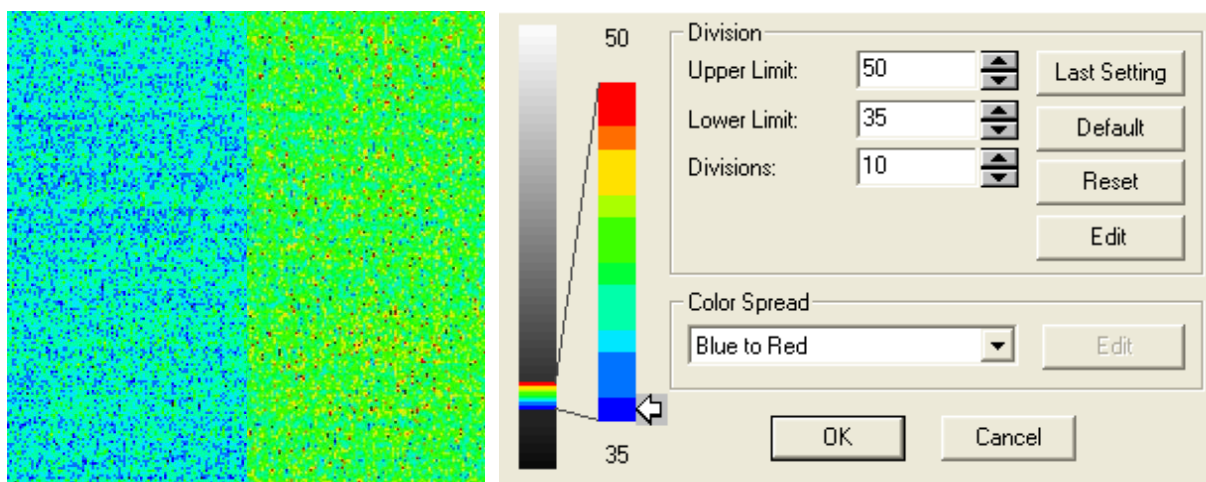
Image solution de fluorescéine, MCP3, **1 intégration** (Rampe de 20 ns). Le maximum au pic est de l'ordre de **6 10²**.

Mean value NL 4.01 +/- 0.14 ns (min = 3.13 ns, max = 4.55)

Mean value ML 4.31 +/- 0.21 ns (min = 3.47 ns, max = 5.59)



Valeur flottante * 10



Cartographie de tau selon un ajustement au moindre carré (NL), au maximum de vraisemblance (ML)