

Analyse de transitoires calciques dans des neurones par mesures de fluorescence. I

Christophe Pouzat

Mathématiques Appliquées à Paris 5 (MAP5)
Université Paris-Descartes et CNRS UMR 8145
`christophe.pouzat@parisdescartes.fr`

Mardi 19 mars 2013

Outline

Introduction

Mesure de la concentration calcique

Mesure de la fluorescence avec une caméra CCD

Pourquoi s'intéresser au calcium ? (1)

Les ions calcium (Ca^{2+}) contrôlent ou influencent des fonctions --- au sens biologique du terme ! --- aussi variées que :

- ▶ la mobilité cellulaire ;
- ▶ la mitose ;
- ▶ la contraction musculaire ;
- ▶ l'exocytose.

La découverte du rôle fondamental des ions calcium est attribuée à Sidney Ringer en 1883 qui, à la suite d'une erreur, s'aperçut qu'une solution saline faite avec de l'*eau du robinet* (donc contenant du calcium) permettait de conserver les battements d'un cœur isolé de grenouille, alors qu'une solution saline faite avec de l'*eau distillée* (donc presque sans calcium) ne le permettait pas.

Pourquoi s'intéresser au calcium ? (2)

- ▶ dans les années 50 on découvre que les ions calcium déclenchent la contraction des muscles squelettiques en se liant à la troponine C ;
- ▶ on découvre aussi que les ions calcium pouvaient être séquestrés dans le réticulum sarcoplasmique ;
- ▶ ces études ont conduit à la notion que **la concentration d'ions calcium change ou oscille dans les cellules.**

Pourquoi s'intéresser au calcium ? (3)

Schéma fonctionnel du réticulum sarcoplasmique

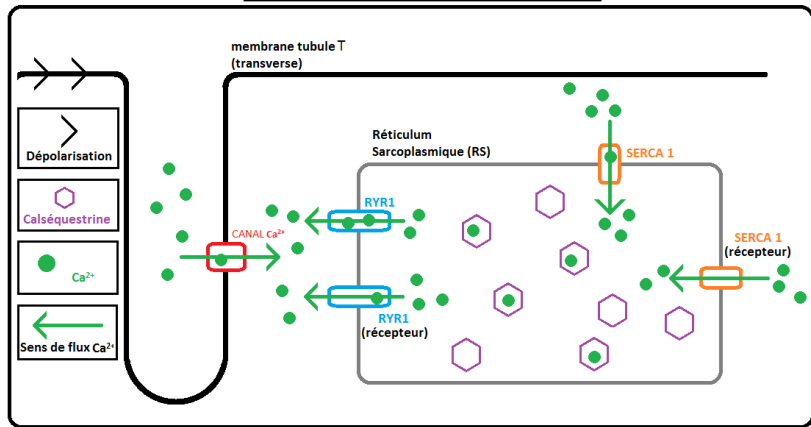
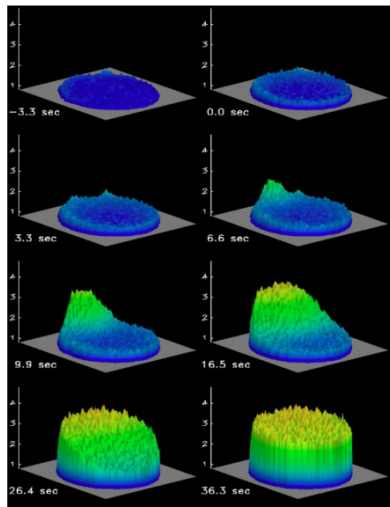


Figure : Fonctionnement du réticulum sarcoplasmique lors de la contraction musculaire (source Wikipédia).

La fécondation est associée à d'énormes vagues calciques



Fertilisation d'un oeuf d'oursin. La vague calcique est initiée au point d'entrée du spermatozoïde et traverse l'oeuf tel un tsunami en une vingtaine de secondes. La concentration est représentée à la fois en fausses couleurs et en hauteur. Source : Whitaker (2006).

Ca²⁺ et transmission synaptique (1)

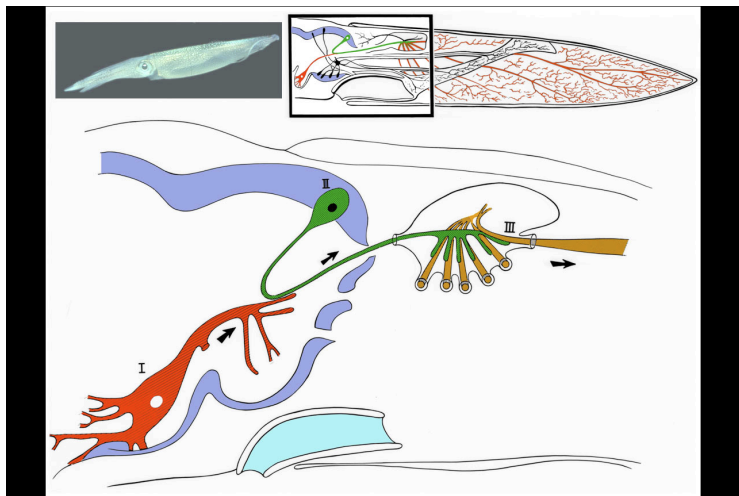


Figure : Un calmar avec ses trois neurones « géants » (I, II et III) et sa « synapse géante » dans le ganglion étoilé (II → III).
Source : Wikipedia (Rodolfo Llinas).

Ca²⁺ et transmission synaptique (2)

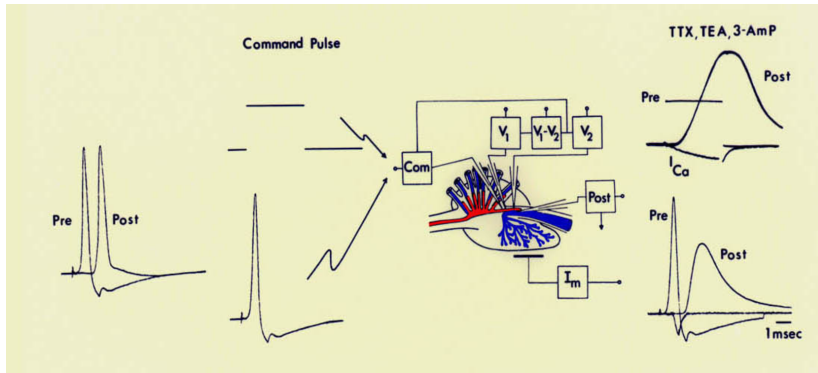
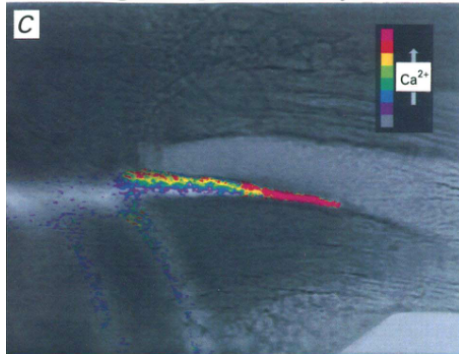
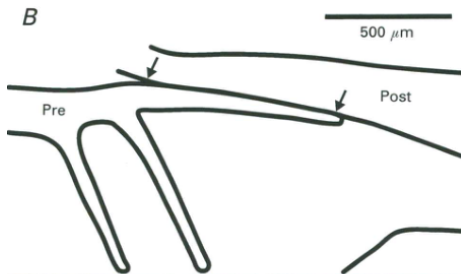


Figure : C'est l'entrée de calcium dans la terminaison pré-synaptique qui déclenche la transmission (détails sur la diapo suivante). Source : Wikipedia (Rodolfo Llinas).

Ca²⁺ et transmission synaptique (2')

À gauche, la séquence « naturelle » potentiel d'action (PA) pré-synaptique (« Pre ») → PA post-synaptique (« Post »). Au centre, le schéma du dispositif expérimental : trois électrodes permettent de travailler en « voltage imposé » (mesure du courant) coté pré-synaptique (rouge) et une seule permet de travailler en « courant imposé » (mesure du potentiel) coté post. Les deux stimulations pré-synaptiques appliquées : le créneau (en haut) et la trajectoire d'un vrai PA (en bas), sont figurées légèrement à gauche. À droite, **après n'avoir gardé que les courants Ca²⁺ en bloquant tous autres** (c'est ce qu'indique le « TTX, TEA, 3-AmP »), le créneau (en haut) provoque une entrée « lente » de Ca²⁺ suivi d'un potentiel post-synaptique, le pseudo-PA (en bas) provoque une brève entrée de Ca²⁺ suivie d'un potentiel post-synaptique. Note : les courants « entrants » vont vers le bas ; remarquez le « délai synaptique ».

Ca²⁺ et transmission synaptique (3)



Changement de fluorescence du colorant Fura-2 (sensible au Ca²⁺), injecté dans la terminaison pré-synaptique (de la synapse géante de calmar) après 40 PAs déclenchés sur une durée de 0,5 sec. Source : Smith et col. (1993).

Mesurer la concentration calcique (1)

Les physiologistes sont de plus en plus intéressés par l'étude des changements de $[Ca^{2+}]$ sur des échelles de temps courtes avec une bonne résolution spatiale et, évidemment ! dans des structures peu accessibles.

Les diapos précédentes sur la synapse géante de calmar ont montré qu'il est possible de mesurer **dans certains cas** le courant calcique, c.-à-d. qu'on peut calculer la quantité de Ca^{2+} qui entre (ou sort) de la cellule.

Mesurer la concentration calcique (2)

Le problème est que :

1. il est rarement possible de mesurer les courants calciques avec une précision suffisante ;
2. tout le Ca^{2+} qui rentre ne se retrouve pas « libre » dans le cytoplasme, une bonne partie va se retrouver lié à des protéines endogènes dont le « job » est précisément de « tamponner » la $[\text{Ca}^{2+}]$; une autre partie va se retrouver séquestrée dans des organites (ou *organelles*, un anglicisme) comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique, etc ; une dernière partie va être « pompée » vers l'extérieur.

C'est précisément l'étude de ces mécanismes de contrôle de la $[\text{Ca}^{2+}]$ qui est à l'origine du cas détaillé que nous allons présenter.

Mesurer la concentration calcique (3)

On pourrait penser utiliser une électrode sensible au Ca^{2+} , comme on le fait pour mesurer la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le plasma sanguin. Ces électrodes sont malheureusement généralement beaucoup trop grosses pour être « plantées » dans les cellules sans « tout casser ». Leur principe de fonctionnement va néanmoins nous permettre de commencer à faire des stats, même si c'est de manière un peu détournée...

Le principe de fonctionnement de ces électrodes repose sur le *potentiel de Nernst* qui est la différence de potentiel électrostatique qui s'établit entre deux solutions **séparées par une membrane perméable à un ion** et contenant des concentrations différentes de cet ion.

Le potentiel de Nernst (1)

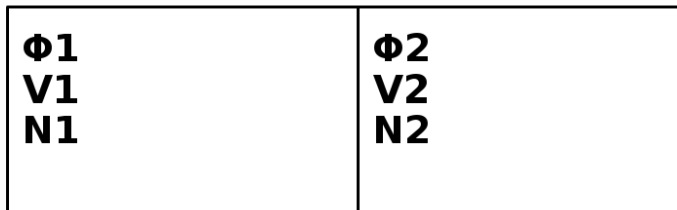


Figure : Un système à deux compartiments, 1 et 2, séparés par une membrane perméable à un ion (dans notre cas le calcium). Φ est le potentiel électrostatique, V est le volume et N le nombre de mol.

Le potentiel de Nernst (2)

Nous allons maintenant employer les « ingrédients » suivants :

- ▶ le postulat de base de la physique statistique qui nous dit que la probabilité de trouver un système à **l'équilibre** dans un *micro-état* ou configuration i d'énergie E_i est donné par la distribution de Boltzmann (ou de Gibbs) : $Pr\{i\} \propto \exp(-E_i/kT)$, où k est la constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J} \times \text{K}^{-1}$) et T est la température absolue (mesurée en Kelvin) ;
- ▶ l'hypothèse que les ions en solutions « ne se voient pas » (ou n'interagissent pas), c.-à-d. qu'il se comportent dans chacun des deux compartiments « comme des gaz parfaits » ; cela revient à dire que, *pour chaque ion*, le nombre de micro-états dans chaque compartiment est proportionnel au volume de celui-ci.

Le potentiel de Nernst (3)

Nous poursuivons alors avec :

- ▶ comme les ions n'interagissent pas et que le nombre de micro-états est proportionnel au volume du compartiment, la probabilité de trouver un ion dans le compartiment 1 est :

$Pr\{1\} = (1/Z)V_1 \exp(-zq\Phi_1/kT)$, où z est la valence de l'ion (ici +2) et q est la charge élémentaire ($\approx 1,6022 \times 10^{-19}$ C), Z est la constante de normalisation appelée fonction de partition ;

- ▶ comme un ion est forcément dans l'un ou l'autre des compartiments : $Pr\{1\} + Pr\{2\} = 1$ soit

$$Z = V_1 \exp(-zq\Phi_1/kT) + V_2 \exp(-zq\Phi_2/kT) ;$$

- ▶ d'où $Pr\{1\} = (1 + V_2/V_1 \exp(-zq\Delta\Phi/kT))^{-1}$,
 $\Delta\Phi = \Phi_2 - \Phi_1$.

Le potentiel de Nernst (4)

Notons $\pi(\Delta\Phi)$ notre $Pr\{1\}$ est supposons que nous calibrons notre électrode, c.-à-d. que nous contrôlons la quantité d'ions Ca^{2+} présents dans chaque compartiment, avant de lire la valeur de la différence de potentiel $\Delta\Phi$.

Avec les hypothèses que nous avons faites, la probabilité d'avoir n_1 ions dans le compartiment 1 et n_2 dans le compartiment 2 s'écrit :

$Pr\{N_1 = n_1, N_2 = n_2\} = \frac{(n_1+n_2)!}{n_1!n_2!} \pi^{n_1} (1 - \pi)^{n_2}$ et notre problème est de trouver (un estimateur de) π .

Si nous choisissons l'estimateur du maximum de vraisemblance (qui est ici le même que celui de la méthode des moments), nous obtenons :

$$\hat{\pi} = n_1 / (n_1 + n_2) = \left(1 + V_2 / V_1 \exp(-zq\widehat{\Delta\Phi} / kT) \right)^{-1}$$

Le potentiel de Nernst (5)

En résolvant pour $\widehat{\Delta\Phi}$ il vient :

$$n_2/n_1 = V_2/V_1 \exp(-zq\widehat{\Delta\Phi}/kT)$$

soit

$$\widehat{\Delta\Phi} = (kT/zq) \log C_1/C_2$$

où $C_i = n_i\mathcal{N}/V_i$ est la concentration (en mol/l, \mathcal{N} est le nombre d'Avogadro $\approx 6,022 \times 10^{23}$).

En général on utilise $k\mathcal{N} = R$ (constante des gaz parfaits $\approx 8,314472 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$) et $q\mathcal{N} = F$ (constante de Faraday $\approx 9,65 \times 10^4 \text{ C} \times \text{mol}^{-1}$) pour écrire le **potentiel de Nernst** :

$$\widehat{\Delta\Phi} = (RT/zF) \log C_1/C_2$$

Le potentiel de Nernst (6)

Une fois notre électrode calibrée, on peut mesurer une concentration C_2 inconnue à partir d'une concentration C_1 connue et d'une lecture de $\Delta\Phi$ avec :

$$C_2 = C_1 \exp\left(-\frac{zF}{RT}\Delta\Phi\right)$$

Mesurer la concentration calcique (4)

- ▶ les sondes / colorants / fluorophores dont les propriétés d'absorption ou d'émission changent quand elles se lient (réversiblement) au Ca^{2+} constituent la base des méthodes « modernes » de mesure de la concentration calcique ;
- ▶ l'emploi de ce type de technique permet une approche « quantitative » lorsqu'on dispose d'un microscope équipé de capteurs « adéquats » comme des capteurs CCD ou des photomultiplicateurs ;
- ▶ dans la suite nous allons nous concentrer sur un type de colorant : le Fura-2 ; dont la fluorescence sera enregistrée au moyen d'une caméra CCD (c.-à-d. une caméra équipé du même type de capteur que vos appareils photos numériques).

Fura-2 (1)

Pour mémoire, la structure du Fura-2...

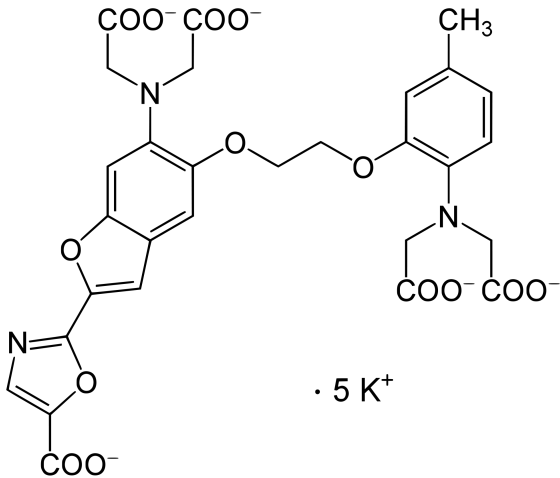


Figure : Source Wikipedia.

Fura-2 (2)

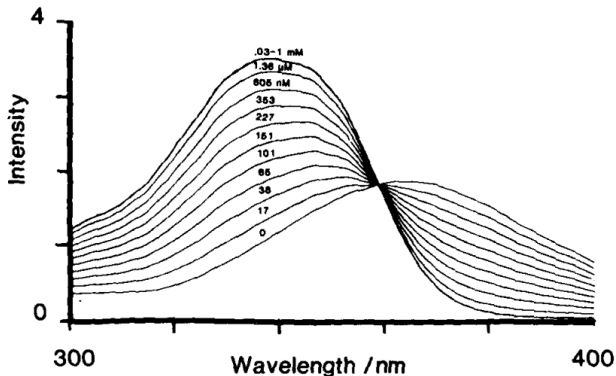


Figure : Spectres d'absorption du Fura-2 en fonction de la $[Ca^{2+}]$. Remarquez le « point isobestique », à 360 nm, où tous les spectres se croisent : à cette longueur d'onde, l'absorption n'est pas dépendante de la $[Ca^{2+}]$. Les mesures sont effectuées à 510 nm. Le spectre d'émission est indépendant de la $[Ca^{2+}]$. Source : Grynkiewicz, Poenie et Tsien (1985).

Fura-2 (3)

- ▶ les spectres se croisent tous à 360 nm parce-qu'ils peuvent tous être vus comme une combinaison convexe des deux spectres extrêmes : celui à $[Ca^{2+}] = 0$ -- le Fura-2 est entièrement sous forme « non-liée » au Ca^{2+} -- et celui ou ceux à 0,03-1 mM -- le Fura-2 est entièrement sous forme liée au Ca^{2+} ;
- ▶ on a en effet la réaction réversible : $F + Ca \rightleftharpoons FCa$, où F représente le Fura-2 libre, Ca représente le Ca^{2+} libre, FCa représente le Fura-2 lié au calcium ;
- ▶ et la loi d'action de masse nous dit qu'à l'équilibre : $K_d = F \cdot Ca / FCa$;
- ▶ donc les spectres des $[Ca^{2+}]$ « intermédiaires » sont des mélanges des deux spectres extrêmes, les poids de ces derniers dans le mélange étant données par la $[Ca^{2+}]$ et la constante K_d ci-dessus.

Fura-2 (4)

- ▶ les physiologistes utilisent généralement deux longueurs d'ondes, 340 et 380 nm, pour exciter le Fura-2 ;
- ▶ les flashes de lampe UV sont de courtes durées (10 ms environ) et présentés l'un après l'autre ;
- ▶ si nous notons S_f le spectre du « Fura-2 libre » ($[Ca^{2+}] = 0$) et S_s le spectre du « Fura-2 saturé » ou lié au Ca^{2+} ($[Ca^{2+}] > 30 \mu M$), nous pouvons écrire l'intensité de fluorescence enregistrée à une longueur d'onde (excitatrice) λ donnée :

$$I(\lambda) = F \cdot S_f(\lambda) + FCa \cdot S_s(\lambda) ;$$

- ▶ et le rapport des intensités aux deux longueur d'onde :

$$R = I(\lambda_2)/I(\lambda_1) = \frac{F \cdot S_f(\lambda_2) + FCa \cdot S_s(\lambda_2)}{F \cdot S_f(\lambda_1) + FCa \cdot S_s(\lambda_1)} .$$

Fura-2 (5)

- ▶ en utilisant la loi d'action de masse nous avons :

$$FCa = F \cdot Ca / K_d ;$$

- ▶ et notre rapport d'intensité devient :

$$R = (S_I(\lambda_2) + S_S(\lambda_2) \cdot Ca / K_d) / (S_I(\lambda_1) + S_S(\lambda_1) \cdot Ca / K_d) ;$$

- ▶ en résolvant pour Ca il vient :

$$Ca = K_d \frac{R \cdot S_I(\lambda_2) - S_I(\lambda_1)}{S_S(\lambda_1) - R \cdot S_S(\lambda_2)} ;$$

- ▶ soit :

$$Ca = K_d \frac{R - S_I(\lambda_1) / S_I(\lambda_2)}{S_S(\lambda_1) / S_S(\lambda_2) - R} \cdot \frac{S_I(\lambda_2)}{S_S(\lambda_2)} ;$$

- ▶ mais $S_I(\lambda_1) / S_I(\lambda_2)$ est le rapport d'intensités observé à concentration nulle (« minimale ») de Ca^{2+} , nous notons donc ce rapport : R_{min} ;

Fura-2 (6)

- ▶ pareillement, $S_s(\lambda_1)/S_s(\lambda_2)$ est le rapport d'intensités observé à concentration maximale (« saturante ») de Ca^{2+} , nous notons donc ce rapport : R_{max} ;
- ▶ et nous obtenons :

$$Ca = K_d \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_I(\lambda_2)}{S_S(\lambda_2)} ;$$

- ▶ connaissant la valeur (ou l'estimation) de R_{min} , R_{max} , $S_I(\lambda_2)/S_S(\lambda_2)$ et K_d -- obtenus par « calibration » -- on déduit une estimation de la $[\text{Ca}^{2+}]$ à partir d'une double mesure d'intensité de fluorescence à deux longueurs d'ondes : c'est la **méthode ratio-métrique**

Fura-2 (7)

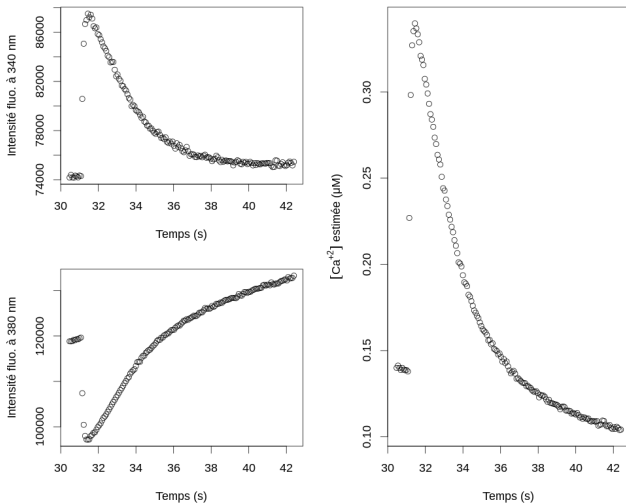


Figure : Un exemple de la méthode « ratio-métrique »

Problème

Le problème principal de la méthode ratio-métrique et, surtout, de la littérature qui l'emploie, est que la question de l'*erreur type* de l'estimateur :

$$\widehat{Ca} = K_d \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_I(\lambda_2)}{S_S(\lambda_2)},$$

n'a pas été vraiment abordée. Cela pose un problème quand on prétend développer une approche « quantitative »...

Améliorer cette situation va être notre prochaine préoccupation. Cela va nécessiter l'examen détaillé d'une caméra CCD.

Principe de fonctionnement d'une CCD

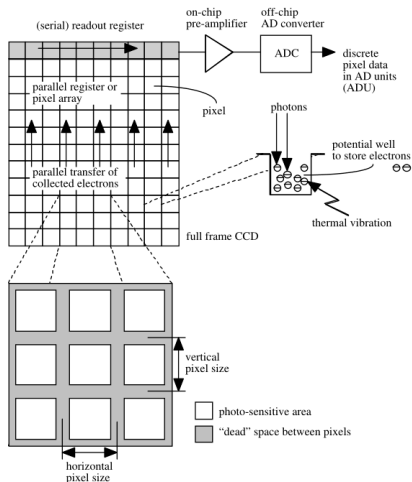


Figure : Le principe de fonctionnement d'une caméra CCD.
Source : L. van Vliet et col. (1998) Digital Fluorescence Imaging Using Cooled CCD Array Cameras (figure 3).

Les sources de bruit d'une CCD (1)

- ▶ le **bruit photonique** ou « bruit de grenaille » (*shot noise* en anglais) vient du fait que mesurer une intensité de fluorescence, λ , implique un **comptage de photons** dont la loi est une loi de Poisson -- à part « changer les lois de la Physique », il n'y a rien à faire pour diminuer ce « bruit » -- :

$$\Pr\{N = n\} = \frac{\lambda^n}{n!} \exp -\lambda, \quad n = 0, 1, \dots, \quad \lambda > 0 ;$$

- ▶ le **bruit thermique** vient du fait que l'agitation thermique peut faire tomber des électrons dans les puits de potentiels, ce bruit suit aussi une loi de Poisson mais il peut être rendu négligeable en *refroidissant* la caméra ;

Les sources de bruit d'une CCD (2)

- ▶ le **bruit de lecture** vient de la conversion d'un nombre de photo-électrons en tension équivalente, il suit une loi normale dont la variance est indépendante de la moyenne (tant qu'on n'effectue pas de lectures à trop haute fréquence) ;
- ▶ le **bruit de numérisation** qui vient de la conversion d'une grandeur continue, la tension, en une valeur sur une grille, il est négligeable dès qu'on dispose de plus de 8 bit de codage.

Un modèle simple de CCD (1)

Nous allons facilement pouvoir obtenir un modèle simple de CCD prenant en compte les deux sources de bruits principales. Mais pour y arriver nous avons besoin de réaliser qu'en général *un grand nombre de photons est détecté*, ce qui va nous permettre d'approcher la loi de Poisson par une loi normale dont la variance est égale à la moyenne :

$$\Pr\{N = n\} = \frac{\lambda^n}{n!} \exp -\lambda \approx \mathcal{N}(\lambda, \lambda) .$$

Écrit plus « concrètement » :

$$N \approx \lambda + \sqrt{\lambda} \epsilon ,$$

où $\epsilon \sim \mathcal{N}(0, 1)$ (suit une loi normale centrée, réduite).

Un modèle simple de CCD (2)

Le bruit de lecture s'ajoute après et suit une loi normale de moyenne nulle et de variance σ_L^2 . On ajoute donc à notre variable aléatoire N une nouvelle v.a. *statistiquement indépendante* $L \sim \mathcal{N}(0, \sigma_L^2)$ ce qui nous donne :

$$M \equiv N + L \approx \lambda + \sqrt{\lambda + \sigma_L^2} \epsilon ,$$

où j'ai utilisé le fait que la somme de deux v.a. normales indépendantes est une v.a. normale dont la moyenne est la somme des moyennes et la variance la somme des variances.

Un modèle simple de CCD (3)

Enfin, la capacité des puits de photo-électrons de la caméra utilisée est de 35000 (c'est une valeur typique) et nous allons numériser ce nombre de photons, après lecture, sur 12 bit (soit 4096 niveaux), nous devons donc appliquer un « gain » G *plus petit que un* si nous voulons pouvoir représenter fidèlement (sans saturation) un puy presque plein. Nous observons ainsi :

$$Y \equiv G \cdot M \approx G \lambda + \sqrt{G^2 (\lambda + \sigma_L^2)} \epsilon .$$

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (1)

Nous allons utiliser la fonction génératrice des moments et en particulier la proposition (Lejeune « Statistique », 2010, p. 80, Proposition 5.13) :

- ▶ si chaque élément de la suite de v.a. X_n admet une fonction génératrice des moments $m_n(t)$;
- ▶ si la v.a. X admet la fonction génératrice des moments $m(t)$;
- ▶ si $m_n(t) \rightarrow m(t)$ quand $n \rightarrow \infty$ pour tout $|t| \leq b$ où $b > 0$;
- ▶ alors $X_n \xrightarrow{L} X$.

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (2)

Montrons donc que :

$$Y_n = \frac{X_n - n}{\sqrt{n}} ,$$

où X_n a une loi de Poisson de paramètre n , converge en loi vers Z v.a. normale réduite.

On a :

$$m_n(t) = \mathbb{E} [\exp(Y_n t)] ,$$

soit :

$$m_n(t) = \sum_{k=0}^{\infty} \exp\left(\frac{k-n}{\sqrt{n}}t\right) \frac{n^k}{k!} \exp(-n) ,$$

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (3)

$$m_n(t) = \exp(-n) \exp(-\sqrt{nt}) \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(n \exp(t/\sqrt{n}))^k}{k!}$$

$$m_n(t) = \exp(-n - \sqrt{nt} + n \exp(t/\sqrt{n}))$$

$$m_n(t) = \exp\left(-n - \sqrt{nt} + n \sum_{k=0}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}}\right)^k \frac{1}{k!}\right)$$

$$m_n(t) = \exp\left(-n - \sqrt{nt} + n + \sqrt{nt} + \frac{t^2}{2} + n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}}\right)^k \frac{1}{k!}\right)$$

$$m_n(t) = \exp\left(\frac{t^2}{2} + n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}}\right)^k \frac{1}{k!}\right)$$

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (4)

Nous devons donc montrer que :

$$n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \rightarrow_{n \rightarrow \infty} 0 \quad \forall |t| \leq b, \quad \text{où } b > 0,$$

puisque $\exp(-t^2/2)$ est la fonction génératrice des moments d'une v.a. normale réduite. Mais

$$\left| n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \right| \rightarrow_{n \rightarrow \infty} 0 \quad \forall |t| \leq b, \quad \text{où } b > 0$$

l'implique puisque

$$- \left| n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \right| \leq n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \leq \left| n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \right|.$$

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (5)

Mais pour tout $|t| \leq b$ où $b > 0$

$$\begin{aligned} 0 \leq \left| n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{t}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \right| &\leq n \sum_{k=3}^{\infty} \left(\frac{|t|}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \\ &\leq \frac{|t|^3}{\sqrt{n}} \sum_{k=0}^{\infty} \left(\frac{|t|}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{(k+3)!} \\ &\leq \frac{|t|^3}{\sqrt{n}} \sum_{k=0}^{\infty} \left(\frac{|t|}{\sqrt{n}} \right)^k \frac{1}{k!} \\ &\leq \frac{|t|^3}{\sqrt{n}} \exp \left(\frac{|t|}{\sqrt{n}} \right) \xrightarrow{n \rightarrow \infty} 0, \end{aligned}$$

ce qui complète la preuve.

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (6)

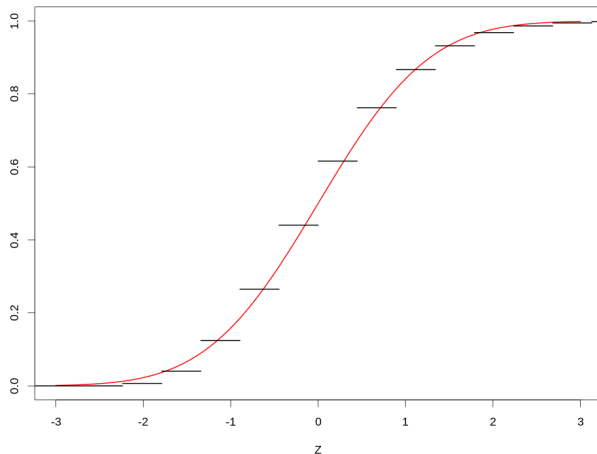


Figure : Fonctions de répartition de Y_5 et Z

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (7)

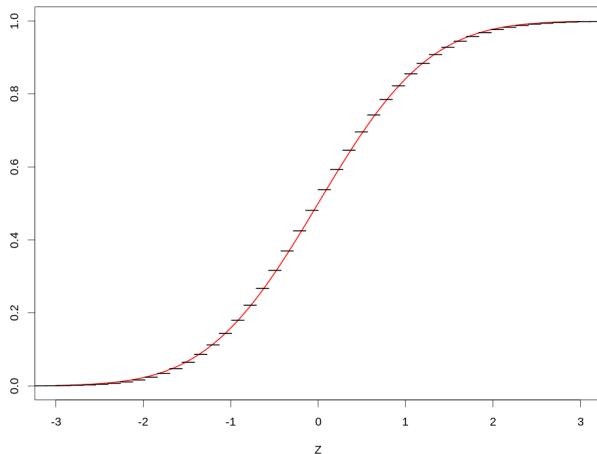


Figure : Fonctions de répartition de Y_{50} et Z

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (8)

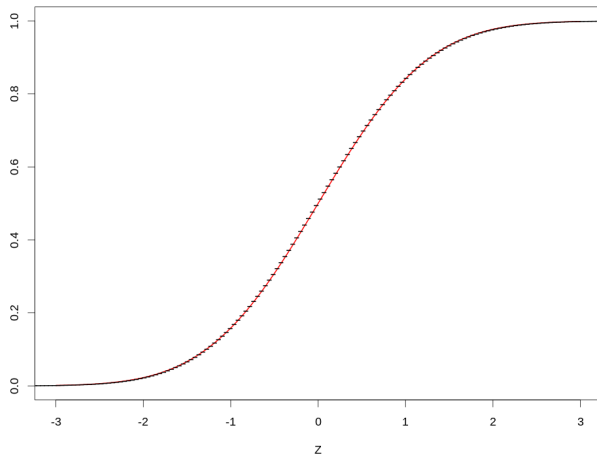


Figure : Fonctions de répartition de Y_{500} et Z

Rappel : convergence en loi d'une loi de Poisson vers une loi normale (9)

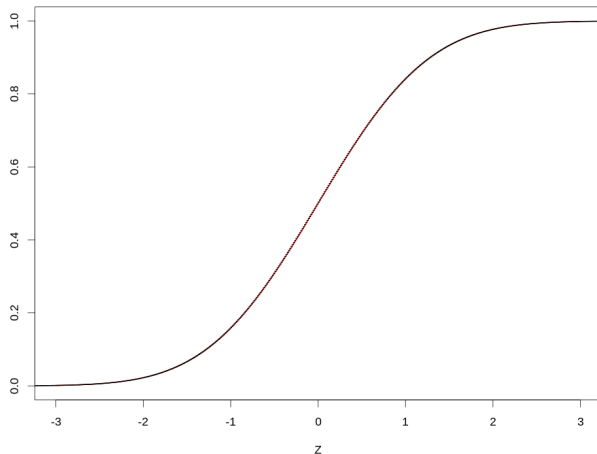


Figure : Fonctions de répartition de Y_{5000} et Z

Calibration d'une CCD (1)

D'après ce qui précède, avec nos deux sources de bruits, nos observations Y suivent la loi :

$$Y \sim G \lambda + \sqrt{G^2 (\lambda + \sigma_L^2)} \epsilon ,$$

où G est le gain de la caméra, σ_L^2 est la « variance de lecture » et ϵ suit une loi normale centrée réduite. La valeur de G et σ_L^2 est une spécification de la caméra, mais l'expérience prouve que les fabricants ont tendance à être trop optimistes sur les performances de leurs produits -- par exemple ils rapportent une valeur de σ_L^2 plus petite que la vraie. **C'est donc une bonne idée de mesurer ces paramètres par des expériences de calibration. Cela va aussi nous permettre de vérifier que notre modèle très simple ci-dessus s'applique.**

Calibration d'une CCD (2)

- ▶ notre problème devient donc : Comment tester $Y \sim G \lambda + \sqrt{G^2 (\lambda + \sigma_L^2)} \epsilon$? Où comment faire varier λ ;
- ▶ considérons un pixel de notre caméra « regardant » un volume fixe d'une solution fluorescente (de la fluorescéine) de concentration elle aussi fixe, nous avons deux façons de manipuler le paramètre λ :
 - ▶ faire changer l'intensité i_e de la lumière excitant notre fluorophore ;
 - ▶ faire varier la durée τ d'exposition.

Calibration d'une CCD (3)

Nous pouvons en effet écrire le λ de notre loi comme suit :

$$\lambda = \phi v c i_e \tau ,$$

où :

- ▶ v est le volume de solution « vu » par le pixel ;
- ▶ c est la concentration de fluorophore ;
- ▶ ϕ est le *rendement quantique* : un paramètre qui décrit l'efficacité d'excitation du fluorophore, les pertes de photons de la lumière excitatrice et de la lumière émise, etc. . .

En pratique, il est plus facile de faire varier le temps d'exposition τ et c'est ce que nous avons fait dans les expériences qui suivent. **Question : quelle expérience allez vous demander à vos collaborateurs ?**

Calibration d'une CCD (4)

J'ai demandé à mes collaborateurs du laboratoire de Peter Kloppenburg à l'Université de Cologne de :

- ▶ choisir 10 temps d'expositions ;
- ▶ pour chacun des 10 temps effectuer 100 expositions successives ;
- ▶ pour chacune des 10 x 100 expositions, enregistrer la valeur y_{ij} prise par la v.a. Y_{ij} au pixel i, j de la CCD.

La raison pour laquelle on introduit une v.a. Y_{ij} par pixel et qu'il est très difficile d'avoir une illumination (i_e), un volume v et un « rendement quantique » (ϕ) uniformément.

On a donc pour chaque pixel :

$$Y_{ij} \sim G p_{ijT} + \sqrt{G^2 (p_{ijT} + \sigma_L^2)} \epsilon_{ij} ,$$

où $p_{ij} = c \phi_{i,j} v_{i,j} i_{e,i,j}$.

Calibration d'une CCD (5)

- ▶ si notre modèle est correct alors pour chaque pixel i, j nous devons avoir, pour un temps d'exposition donné, une moyenne empirique :

$$\bar{y}_{ij} = \frac{1}{100} \sum_{k=1}^{100} y_{ij,k} \approx \mathbf{G} p_{ij} \tau ;$$

- ▶ un variance empirique :

$$S_{ij}^2 = \frac{1}{99} \sum_{k=1}^{100} (y_{ij,k} - \bar{y}_{ij})^2 \approx \mathbf{G}^2 (p_{ij} \tau + \sigma_L^2) ;$$

- ▶ et le graphe de S_{ij}^2 en fonction de \bar{y}_{ij} devrait être une droite de pente \mathbf{G} et d'ordonnée en zéro $\mathbf{G}^2 \sigma_L^2$.

Calibration d'une CCD (6)

Le jeu de données de calibration, enregistré par Andreas Pippow, se trouve sous forme de données R à l'adresse : <http://xtof.disque.math.cnrs.fr/data/Gain.2nd.RData>. On le charge donc simplement dans R avec :

```
toto <- "http://xtof.disque.math.cnrs.fr/data/"
la <- paste(toto, "Gain.2nd.RData", sep="")
download.file(la,
              "Gain.2nd.RData", mode="wb")
load("Gain.2nd.RData")
```

Calibration d'une CCD (7)

- ▶ le jeu de données `Gain.2nd` est une liste de listes, il y a une sous-liste pour chacun des 10 temps d'exposition ;
- ▶ la première sous-liste « ressemble à » :

```
str(Gain.2nd[[1]])
```

```
List of 4
```

```
$ image.data : int [1:60, 1:80, 1:100] 383 380 3  
$ exposureTime: num 0.01  
$ wavelength  : num 324  
$ time        : num [1:100] 0.034 0.434 0.834 1.234
```

Calibration d'une CCD (8)

- ▶ le composant `image . data` contient les données $y_{i,j,k}$, c.-à-d. que la troisième dimension correspond aux répliques ;
- ▶ le composant `exposureTime` donne le temps d'exposition utilisé (en s) ;
- ▶ le composant `wavelength` donne la longueur d'onde excitatrice (en nm) ;
- ▶ le composant `time` est un vecteur de temps du début de chaque exposition / réplique.

Calibration d'une CCD (9)

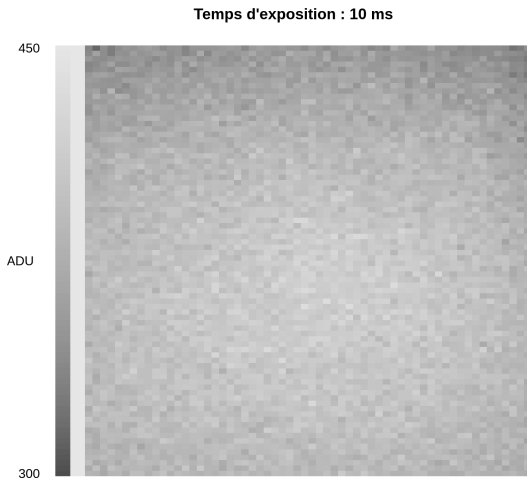


Figure : La première exposition de 10 ms

Calibration d'une CCD (10)

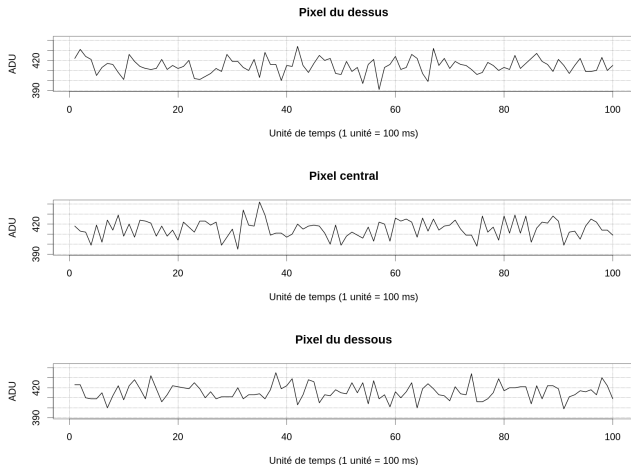


Figure : Évolution temporelle des observations pour trois pixels voisins et un temps d'exposition de 10 ms.

Calibration d'une CCD (11)

- ▶ comme les données vont être analysées comme si les $Y_{i,j,k}$ étaient IID, **mais qu'elles ont en fait été enregistrées séquentiellement**, il est **fortement recommandé** de vérifier qu'elles se comportent comme si elles étaient IID ;
- ▶ le petit exemple de la figure précédente montre qu'il n'y a pas de dérive ;
- ▶ il faut aussi regarder les fonctions de corrélations.

Calibration d'une CCD (12)

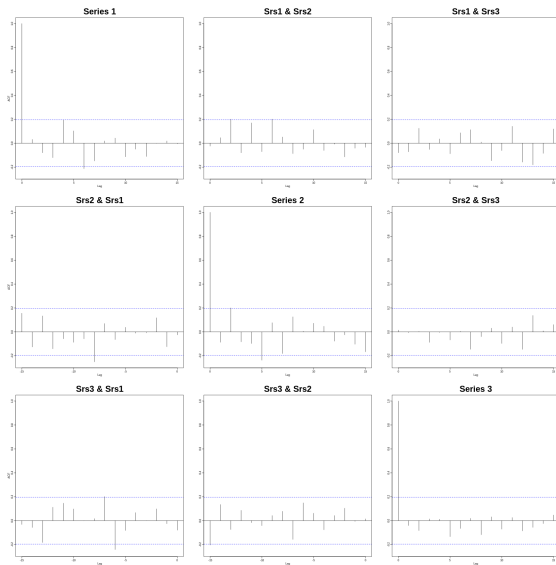


Figure : Compatibilité avec l'hypothèse IID : absence de

Calibration d'une CCD (13)

Nous pouvons maintenant calculer la moyenne empirique :

```
ADU.m <- as.vector(  
  sapply(1:length(Gain.2nd),  
    function(idx)  
      apply(Gain.2nd[[idx]][["image.data"]],  
        c(1,2), mean)))
```

et la variance empirique :

```
ADU.v <- as.vector(  
  sapply(1:length(Gain.2nd),  
    function(idx)  
      apply(Gain.2nd[[idx]][["image.data"]],  
        c(1,2), var)))
```

et voir ce que ça donne...

Calibration d'une CCD (14)

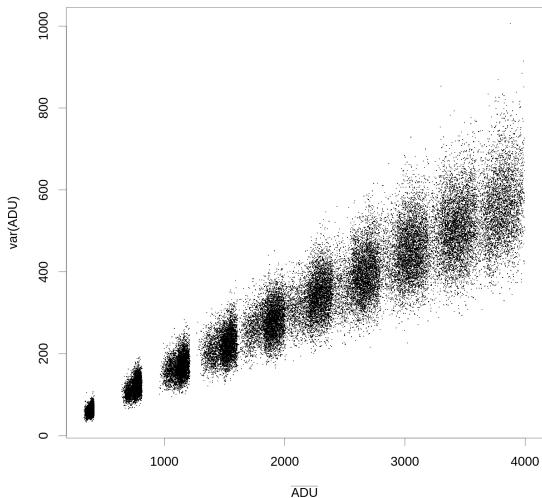


Figure : La variance en fonction de la moyenne.