

Détection et suivi d'objets ponctuels dans des séquences d'images de fluorescence

Detection and tracking of punctual objects in sequences of fluorescence images

Stéphane Bonneau^{†,§}, Maxime Dahan[§] et Laurent Cohen[†]

[†] CEREMADE
Université Paris Dauphine
Place du Maréchal de Lattre de Tassigny
75775 Paris cedex 16, FRANCE

[§] Laboratoire Kastler Brossel
Ecole Normale Supérieure
24, rue Lhomond
75231 Paris cedex 05, FRANCE

bonneau@ceremade.dauphine.fr, maxime.dahan@lkb.ens.fr, cohen@ceremade.dauphine.fr

Résumé

Nous présentons une nouvelle technique pour automatiquement détecter et suivre, dans des séquences d'images de fluorescence 2D, des objets ponctuels visibles par intermittence. Nous montrons l'intérêt de notre approche pour suivre, en milieu vivant et à l'échelle moléculaire, des protéines membranaires auxquelles sont spécifiquement attachées des nanocristaux semiconducteurs, de nouvelles sondes de fluorescence aux propriétés très prometteuses pour l'imagerie ultrasensible *in vivo*.

La séquence d'images 2D est interprétée comme une image 3D dans un espace spatio-temporel. Une première étape de détection, basée sur un modèle de l'image de fluorescence, permet d'obtenir un ensemble non structuré de points dans le volume 2D+T. Les trajectoires des points en mouvement sont alors considérées comme des chemins minimaux dans une métrique dépendant des caractéristiques de l'image 3D. Ces trajectoires sont reconstruites avec une technique de groupement perceptuel basée sur l'algorithme de Fast Marching. Notre méthode, qui requiert peu de paramètres, est illustrée par l'étude de la dynamique des récepteurs de la glycine dans la membrane neuronale.

Mots Clef

Détection, segmentation, estimation du mouvement dans une séquence d'images. Imagerie biologique.

Abstract

We present a new method for automatically detecting and tracking, in sequences of 2D fluorescence images, punctual objects which are intermittently visible. We demonstrate the ability of our approach to track, in live cells and at a molecular level, membrane proteins specifically attached to quantum dots, which are new fluorescent probes with great prospects for ultrasensitive *in vivo* imaging.

The fluorescence 2D image stack is considered as a 3D image in a spatio-temporal space. By applying a detection process based on a fluorescence image model, we first

obtain an unstructured set of points in the 2D+T volume. The trajectories of moving points are then viewed as minimal paths in a metric which depends on the 3D image features. These trajectories are retrieved with a perceptual grouping approach based on the Fast Marching algorithm. Our method, which requires few parameters, is illustrated by studying the dynamics of glycine receptors in the neuronal membrane.

Keywords

Detection, segmentation, motion estimation in a sequence of images. Biological imaging.

1 Introduction

Le suivi de molécules uniques est certainement l'une des méthodes les plus sensibles pour mesurer les dynamiques moléculaires dans les cellules vivantes [19]. Avec cette approche, un marqueur (ou sonde) est spécifiquement attaché à une protéine dont le mouvement latéral au sein de la membrane plasmique est mesuré avec de grandes résolutions spatiale (environ 10 nanomètres) et temporelle (de l'ordre de la milliseconde). Pour vraiment accéder aux propriétés des molécules individuelles et ne pas altérer la dynamique des biomolécules marquées, la sonde utilisée doit générer un signal lumineux intense et être aussi petite que possible. Leur petite taille (5 à 15 nm), leur forte intensité lumineuse et leur grande photostabilité font des nanocristaux semiconducteurs (NCS) des marqueurs de fluorescence particulièrement prometteurs parmi tous ceux utilisés récemment [20]. Les NCS ont par exemple permis de suivre les récepteurs de la glycine dans la membrane neuronale pendant plus de 20 minutes [11].

Marquer des molécules uniques avec des NCS permet d'obtenir des séquences de plusieurs centaines (voire milliers) d'images de fluorescence 2D exhibant le mouvement simultané des différentes molécules marquées. Pour extraire une information pertinente de cette grande masse de données brutes, une méthode est requise pour automatique-

ment détecter et suivre les sondes en mouvement. Il s'agit cependant d'un problème difficile, notamment parce que les images de fluorescence sont bruitées (les grandes résolutions spatiale et temporelle limitent le nombre de photons détectables) mais surtout parce que la fluorescence des NCS est intermittente. En effet, l'émission de fluorescence des NCS alterne aléatoirement entre un état allumé et un état éteint (cf. Fig.1.a) [17].

Jusqu'à présent, différentes méthodes ont été proposées pour détecter et suivre des objets en imagerie dynamique de fluorescence. La plupart procèdent à une analyse image par image de la séquence. L'analyse d'une image est alors décomposée en deux étapes :

- Tout d'abord, les spots de fluorescence sont détectés et localisés avec précision. Cette étape de détection nécessite généralement la réduction du bruit de l'image, par diffusion anisotrope [31], seuillage par ondelettes [15, 28] ou filtrage adaptatif basé sur un modélisation du montage optique [1, 28, 29].
- Ensuite, les spots détectés sont mis en correspondance avec les trajectoires obtenues à partir des images précédentes. Puisque les objets à suivre sont ponctuels, la seule information disponibles pour effectuer cette mise en correspondance est la position des spots détectés. Différentes méthodes ont été proposées pour résoudre ce problème, avec une approche statistique [9, 10, 21] ou heuristique [4, 25, 32],

Cependant, aucune de ces technique n'est spécifiquement dédiée à la détection et au suivi de multiples spots de fluorescence pouvant aléatoirement disparaître et réapparaître. Nous présentons ici une nouvelle méthode susceptible de pallier ce manque. A la différence des approches traditionnelles qui analysent un film image par image, nous assimilons la séquence d'images 2D à un volume 3D spatio-temporel. Dans ce volume 2D+T, les trajectoires moléculaires sont des courbes 3D que nous considérons comme des chemins minimaux dans une métrique dépendant des caractéristiques de l'image 3D. Nous proposons de reconstruire ces chemins avec une technique de minimisation d'énergie. Tout d'abord, une première étape permet de détecter les spots de fluorescence à partir d'un modèle de l'image de fluorescence 2D et donne un ensemble non structuré de points dans le volume 2D+T. Une seconde étape permet alors d'associer entre eux les points issus de la phase de détection. Le problème de mise en correspondance est ainsi réinterprété comme un problème de groupement perceptuel étant donné un ensemble non structuré de points et une image 3D. Nous cherchons séquentiellement les paires de points (parmi l'ensemble des spots détectés) à associer et les chemins qui les relie tels que ces chemins soient des géodésiques dans une métrique riemannienne définie à partir de l'image 3D.

Cet article est organisé comme suit. Dans la section 2, nous présentons l'étape de détection des spots de fluorescence. Dans la section 3, nous décrivons notre approche d'association des spots détectés, basée sur les chemins minimaux,

et discutons de l'implémentation de notre méthode. Enfin, dans la section 4, nous présentons quelques résultats expérimentaux.

Dans ce qui suit, nous considérons la séquence d'images de fluorescence comme un volume spatio-temporel $I(x, y, z)$ où (x, y) sont les coordonnées spatiale et z l'index de l'image 2D. La taille de ce volume est notée $N_x \times N_y \times N_z$. Par souci de clarté, l'image plane $I(\cdot, \cdot, z)$ est également notée $I_{|z}$.

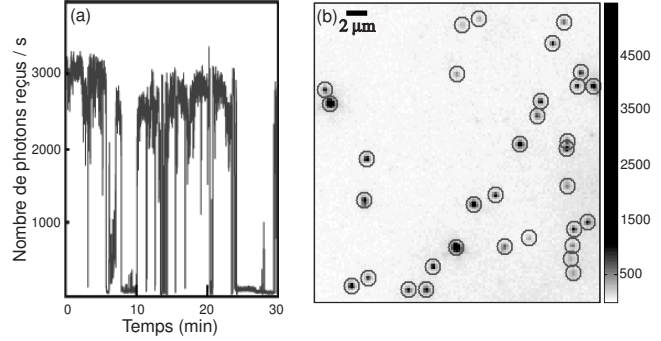


FIG. 1 – (a) Trace temporelle de l'intensité de fluorescence d'un NCS unique. (b) Image de fluorescence 2D. Pour une meilleure lisibilité, l'image a été saturée et les couleurs inversées. Les cercles correspondent aux spots détectés.

2 Détection des spots de fluorescence

Dans cette partie, nous présentons une approche de détection automatique des spots de fluorescence. Le seul paramètre requis est un seuil de détection défini comme le rapport signal-à-bruit minimal permettant la détection d'un spot. Notre méthode est basée sur un modèle de l'image de fluorescence et permet de localiser les spots avec une précision subpixelique. L'algorithme de détection est séquentiellement appliqué à chaque image 2D de la séquence.

2.1 Modélisation de l'image de fluorescence

Un NCS peut être considéré comme une source ponctuelle de lumière dans la mesure où sa taille est largement inférieure à la longueur d'onde λ de la lumière qu'il émet. Par conséquent, l'image 2D d'un NCS isolé correspond à la réponse impulsionnelle du montage optique (PSF, de l'anglais *Point Spread Function*) et peut être raisonnablement modélisée par une fonction gaussienne 2D isotrope d'écart-type $\sigma_{\text{PSF}} = R_A/3$, où $R_A \approx 1.22\lambda/2N_A$ désigne le rayon d'Airy et N_A l'ouverture numérique.

L'image de fluorescence 2D résulte du produit de convolution de la PSF avec la distribution spatiale des points sources (cf. Fig.1.b). Si le montage optique est calibré de manière à ce que le gain de la caméra soit unitaire, alors l'intensité associée à chaque pixel de l'image 2D correspond au nombre de photons détectés auquel s'ajoute une constante appelée ligne de base et notée c_L . Nous supposons que les images de fluorescence sont corrompues par la superposition de deux bruits indépendants : un bruit de

photons et un bruit de fond [30]. Le bruit de photons, dû à la nature quantique de la lumière, est modélisé par une loi de Poisson dont la variance est donnée par le nombre de photons reçus. Le bruit de fond est modélisé par une distribution gaussienne de moyenne nulle et de variance σ_N^2 indépendante du nombre de photons reçus. Ainsi, l'incertitude sur l'intensité $I_{|z}(x, y)$ est définie par :

$$\text{Var}[I_{|z}(x, y)] = I_{|z}(x, y) - c_L + \sigma_N^2.$$

2.2 Estimation des paramètres c_L et σ_N

Notre algorithme de détection requiert l'estimation des paramètres c_L et σ_N , qui sont tous deux indépendants du signal de fluorescence. Les hypothèses suivantes sont introduites. Nous supposons d'abord que l'illumination est homogène sur la zone observée et que la majorité des pixels de $I_{|z}$ correspond au fond de l'image. De plus, nous supposons que la distribution des intensités de l'image $I_{|z}$ est un mélange de deux distributions gaussiennes : une distribution étroite (centrée sur c_L et associée au fond de l'image) et une distribution plus large (qui reflète la distribution des photons émis par les NCS). Par conséquent, estimer la moyenne de la plus étroite des deux distributions gaussiennes permet d'estimer c_L .

A partir de l'image de fluorescence $I_{|z}$, de simples filtres linéaires permettent d'obtenir les images auxiliaires $I_{|z}^m$ et $I_{|z}^\sigma$, telles que $I_{|z}^m(x, y)$ et $I_{|z}^\sigma(x, y)$ correspondent respectivement à la moyenne locale de $I_{|z}$ et à l'écart-type local de $I_{|z}$ au voisinage du pixel de coordonnées (x, y) . En appliquant l'algorithme EM [12] à la distribution des intensités de l'image moyennée $I_{|z}^m$ (respectivement à la distribution des intensités de l'image des fluctuations $I_{|z}^\sigma$), il est facile d'extraire une estimation $\widehat{c}_L(z)$ du paramètre c_L (respectivement une estimation $\widehat{\sigma}_N(z)$ du paramètre σ_N).

2.3 Détection par intercorrélation

L'intercorrélation normalisée est une technique particulièrement adaptée à la détection des spots de fluorescence puisque ces derniers sont isotropes et de taille connue. Considérons le noyau de convolution G obtenu en discrétisant une fonction gaussienne 2D isotrope d'écart-type σ_{PSF} . Notons G^m et G^σ la moyenne et l'écart-type de G sur son support. L'intercorrélation normalisée $\gamma_{|z}$, définie de la manière suivante ¹ :

$$\gamma_{|z} = \frac{(I_{|z} - I_{|z}^m) \star (G - G^m)}{I_{|z}^\sigma G^\sigma},$$

est une mesure de similarité entre le modèle G et l'image de fluorescence $I_{|z}$. Notons que la transformée de Fourier rapide permet de calculer avec efficacité $I_{|z}^m$, $I_{|z}^\sigma$ et $\gamma_{|z}$. Les maxima locaux de $\gamma_{|z}$ constituent un ensemble de positions potentielles de spots de fluorescence, mais certains de ces maxima résultent du bruit seul et doivent être exclus.

¹Ici, \star désigne l'opérateur de corrélation.

Soit (x_m, y_m) les coordonnées d'un maximum de corrélation. En estimant l'incertitude sur l'intensité $I_{|z}(x_m, y_m)$ par :

$$\text{Var}[I_{|z}(x_m, y_m)] \approx I_{|z}(x_m, y_m) - \widehat{c}_L(z) + \widehat{\sigma}_N^2(z),$$

on peut facilement définir un intervalle de confiance $\Delta I_{|z}(x_m, y_m) = \mathbf{S}_D \sqrt{\text{Var}[I_{|z}(x_m, y_m)]}$ où \mathbf{S}_D est un seuil de détection fixé a priori correspondant au rapport signal-à-bruit minimal permettant la détection d'un spot. On décide alors que l'image $I_{|z}$ présente un spot en (x_m, y_m) si :

$$I_{|z}(x_m, y_m) - \widehat{c}_L(z) > \Delta I_{|z}(x_m, y_m).$$

2.4 Localisation subpixelique des spots

Afin de localiser chaque spot détecté avec une précision subpixelique pour un faible coût de calcul, un estimateur à trois points est appliqué dans les directions x et y . Soit (x_m, y_m) les coordonnées pixeliques d'un spot détecté dans l'image $I_{|z}$. La coordonnée subpixelique de ce spot le long de l'axe x , notée x_0 , est calculée de la manière suivante :

$$x_0 = x_m + \frac{J_{(-1,0)} - J_{(1,0)}}{2J_{(-1,0)} - 4J_{(0,0)} + 2J_{(1,0)}}$$

où $J_{(i,j)} = \log [I_{|z}(x_m + i, y_m + j) - \widehat{c}_L(z)]$. Le même calcul est appliqué dans la direction orthogonale afin d'obtenir la coordonnée subpixelique y_0 . La précision de cet estimateur à trois points, évaluée à partir de simulation de Monte-Carlo, est d'environ 0.1 pixel dans chaque direction. Une localisation encore plus précise peut être obtenue, pour un coût de calcul nettement supérieur, en effectuant une régression gaussienne non-linéaire [30].

3 Association des spots détectés

L'application de l'algorithme de détection à chaque image de la séquence permet d'obtenir un ensemble non structuré de points dans le volume 2D+T. Dans cette partie, nous présentons une approche destinée à associer et relier les spots détectés afin d'obtenir un ensemble de trajectoires décrivant le mouvement des marqueurs de fluorescence.

3.1 Définition

Une trajectoire est une courbe 3D décrite par une liste de points (x, y, z) définis dans le volume 2D+T et ordonnés par valeur croissante de la coordonnée z . Pour un point donné (x, y, z) d'une trajectoire, les coordonnées spatiales (x, y) peuvent prendre des valeurs réelles, mais la coordonnée temporelle z ne peut prendre qu'une valeur entière appartenant à l'ensemble $\{1, \dots, N_z\}$. Le premier point d'une trajectoire (i.e. le point ayant la coordonnée z minimale) est appelée *queue de trajectoire*, et le dernier point *tête de trajectoire*. Notons z_q et z_t les coordonnées z de la *queue* et de la *tête* d'une trajectoire. Alors, cette trajectoire est définie par un unique point dans chaque plan d'index z où z parcourt l'ensemble $\{z_q, z_q + 1, \dots, z_t - 1, z_t\}$.

3.2 Contraintes de suivi

Une *contrainte d'unicité* est adoptée : chaque spot détecté ne peut être associé à plus d'une trajectoire et chaque trajectoire ne peut être associée à plus d'un spot détecté dans une image donnée de la séquence.

D'après les modèles standard de la membrane plasmique (et notamment le *modèle de mosaïque fluide* [24]), les protéines membranaires diffusent librement dans le plan de la membrane cellulaire à cause de l'agitation thermique des molécules du milieu. Dans un système bidimensionnel homogène, la densité de probabilité \mathcal{P} qu'une molécule brownienne parcourt une distance r dans un intervalle de temps τ est :

$$\mathcal{P}(r, \tau, D) = \left(\frac{1}{4\pi D\tau} \right) \exp\left(-\frac{r^2}{4D\tau} \right)$$

où D est le coefficient de diffusion de la molécule. Notons Ψ la probabilité que la distance maximale parcourue par cette molécule en Δ_z images soit r_Ψ :

$$\Psi = \int_0^{r_\Psi} \mathcal{P}(r, t_s \Delta_z, D) 2\pi r dr$$

où t_s la période d'échantillonnage temporelle. Si la valeur de Ψ est a priori fixée, alors $r_\Psi = c_\Psi \sqrt{D\Delta_z}$ où D est exprimé en pixel^2/t_s et $c_\Psi = \sqrt{4|\log(1-\Psi)|}$ est une constante. A chaque spot détecté peut donc être associée une région de recherche paraboloidique (cf. Fig.2.a) définie par tout point (x, y, z) du volume 2D+T satisfaisant :

$$\sqrt{(x-x_s)^2 + (y-y_s)^2} \leq c_\Psi \sqrt{D|z-z_s|}, \quad (1)$$

où (x_s, y_s, z_s) sont les coordonnées du spot, c_Ψ une constante ne dépendant que de Ψ (qu'on suppose a priori fixée) et D une estimation du coefficient de diffusion de la molécule représentée par le spot. La *contrainte de vraisemblance* impose que deux spots ne peuvent être associés que si au moins l'un des deux appartient à la région de recherche de l'autre.

3.3 Approche proposée

L'apparence des spots n'est pas une information suffisamment discriminante pour permettre leur association. En effet, les NCS ne peuvent être distingués entre eux puisqu'ils sont de petite taille et présentent de larges fluctuations d'intensité au cours du temps. Appairer des points à partir de leurs seules positions tout en autorisant une occultation totale de certains d'entre eux sur plusieurs images successives est connu pour être un problème NP-difficile. Cependant, le faible signal de fluorescence, réel mais en-deça du seuil de détection, est une information pertinente que nous proposons de mettre à profit pour guider le processus d'association.

Plutôt qu'analyser le film image par image, nous considérons la séquence d'images 2D comme une image 3D définie dans un espace spatio-temporel. Pour reconstruire les trajectoires des émetteurs de fluorescence, qui sont des

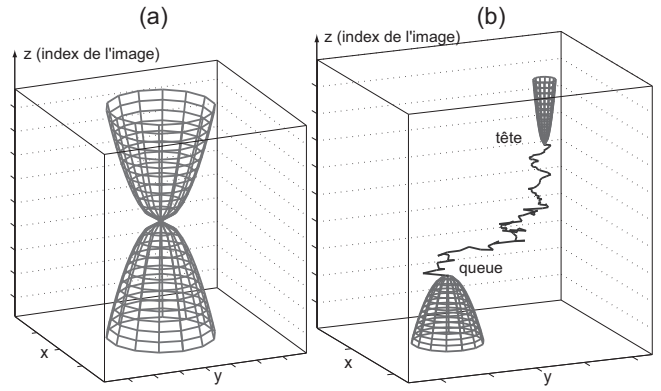


FIG. 2 – (a) A chaque spot détecté est associée une région de recherche paraboloidique définie dans l'espace spatio-temporel. (b) Si la dynamique d'une molécule varie au cours du temps, les coefficients de diffusion associés à la *queue* et à la *tête* d'une même trajectoire peuvent être très différents. Ce changement de dynamique est automatiquement pris en compte dans la définition des régions de recherche.

courbes 3D dans le volume 2D+T, nous cherchons séquentiellement les paires de points (parmi l'ensemble des spots détectés) à associer et les chemins qui les relie tels que ces chemins soient des géodésiques dans une métrique riemannienne définie à partir de l'image I .

Notre méthode d'association se déroule en deux étapes successives. Tout d'abord, nous associons les spots détectés dans deux images consécutives de la séquence en utilisant, à chaque itération, le critère du plus proche voisin au sens d'une distance pondérée. Cette première étape permet d'établir un ensemble de *trajectoires partielles*, une trajectoire partielle n'étant composée que de points détectés dans des images successives. A cause d'éventuelles fausses détections et du clignotement des NCS, plusieurs trajectoires partielles définies sur des intervalles temporels disjoints peuvent correspondre à la trajectoire d'une même molécule. Aussi ces trajectoires partielles sont reliées entre elles avec des chemins minimaux afin d'obtenir des *trajectoires complétées*. Cette seconde étape peut être interprétée comme une extension au suivi d'objets ponctuels de l'approche plus générale visant à compléter des courbes avec des chemins minimaux [5, 7].

3.4 Métrique dépendant de l'image I

Le problème d'association est interprété comme la recherche d'un ensemble de chemins minimaux dans une métrique qui dépend de l'image I . Par conséquent, une métrique pertinente doit être définie. Comme expliqué plus bas, un chemin minimal entre deux points donnés est une courbe joignant ces deux points le long de laquelle l'intégrale d'un potentiel P est minimale. Puisque nous voulons que ce chemin minimal corresponde à la trace temporelle d'une particule fluorescente, le chemin doit préférentiellement suivre les pixels de l'image de fluorescence ayant une

grande intensité. Aussi, on peut simplement définir le potentiel comme l'inverse de l'image I :

$$P(x, y, z) = \frac{1}{I(x, y, z) + 1}.$$

Donc, P est un volume de taille $N_x \times N_y \times N_z$ prenant de petites valeurs là où le signal de fluorescence est grand. D'autres fonctions de I peuvent également être considérées afin d'obtenir un potentiel rehaussant les spots par rapport au fond de l'image ou les structures tubulaires de l'image 3D [18]. Dans cet article, nous nous sommes néanmoins limités à l'expression donnée ci-dessus.

3.5 Création des trajectoires partielles

Les paires de spots détectés dans deux images consécutives de la séquence et satisfaisant les contraintes de suivi sont séquentiellement associées pour constituer un ensemble de trajectoires partielles. A chaque itération est choisie la paire de spots avec le plus petit coût d'association, ce coût étant donné par l'intégrale du potentiel P le long du segment de droite séparant les deux spots.

Pour appliquer la contrainte de vraisemblance, la rayon de la zone de recherche circulaire, qui correspond à la distance maximale couverte par la molécule pendant la durée t_s , est calculée à partir de la probabilité Ψ , qui est un paramètre d'entrée, et à partir d'une estimation du coefficient de diffusion. Le coefficient de diffusion affecté à un spot qui est la *tête* (ou la *queue*) d'une trajectoire partielle peut facilement être estimé si la trajectoire partielle est suffisamment longue¹. Ainsi, l'algorithme est en mesure d'adapter la zone de recherche afin de prendre en compte d'éventuelles variations de la dynamique des molécules (cf. Fig.2.b). Sinon, une valeur arbitraire D_{ini} est affectée au spot.

L'algorithme proposé est détaillé dans la Table 1. Son exécution s'interrompt automatiquement quand toutes les paires de spots satisfaisant les contraintes de suivi ont été reliés. La Figure 4.c montre quelques résultats typiques obtenus avec cette approche.

Cet algorithme présente trois avantages principaux. D'abord, l'association est faite globalement dans tout le volume spatio-temporel. Ainsi, cette approche est plus robuste qu'une méthode procédant à une analyse image par image qui n'utilise que les informations obtenues à partir des images précédentes. Ensuite, cette technique est relativement peu sensible aux fausses détections puisqu'elle ne prend pas en compte les points isolés parmi l'ensemble des spots détectés. Enfin, c'est un algorithme rapide, et facile à implémenter.

3.6 Travaux relatifs aux chemins minimaux

Avant d'expliquer comment les trajectoires partielles sont reliées entre elles, nous donnons une brève description des travaux antérieurs relatifs aux chemins minimaux. Les techniques de minimisation d'énergie ont été appliquées à une grande variété de problèmes en traitement d'images.

¹L'estimation du coefficient de diffusion est détaillée dans [23, 24].

Définition :

- S_i^z désigne le $i^{\text{ème}}$ spot détecté dans l'image d'index z . Les coordonnées de ce spot sont notées (x_i^z, y_i^z, z) .
- $M^{w,z}$ est la matrice des distances pondérées séparant les spots détectés dans les images successives d'index z et $(z+1)$. $M_{i,j}^{w,z}$ est estimé en intégrant le potentiel P le long du segment allant de (x_i^z, y_i^z, z) à $(x_j^{z+1}, y_j^{z+1}, z+1)$.
- $M^{e,z}$ est la matrice des distances euclidiennes séparant les spots détectés dans les images successives d'index z et $(z+1)$ telle que : $M_{i,j}^{e,z} = \sqrt{(x_i^z - x_j^{z+1})^2 + (y_i^z - y_j^{z+1})^2}$.
- R^z est un vecteur tel que R_i^z est le rayon de la zone de recherche circulaire associée au spot S_i^z .
- L est l'ensemble des paires de spots satisfaisant la contrainte de vraisemblance, i.e. la liste de triplets (i, j, z) définie par : $L = \{(i, j, z) \text{ tel que } \{M_{i,j}^{e,z} \leq R_i^z \text{ ou } M_{i,j}^{e,z} \leq R_j^{z+1}\}\}$.

Initialisation :

- Pour chaque index d'image z , calculer $M^{w,z}$, $M^{e,z}$ et assigner $R^z = c_\Psi \sqrt{D_{ini}}$, où $c_\Psi = \sqrt{4|\log(1 - \Psi)|}$.
- Créer la liste L .

Boucle :

Tant que L est non-vide, faire :

- Trouver (i^*, j^*, z^*) tel que $M_{i^*,j^*}^{w,z^*} = \min_{(i,j,z) \in L} \{M_{i,j}^{w,z}\}$.
- Assigner $M_{i^*,j^*}^{e,z^*} = \infty$ et $M_{i^*,j^*}^{w,z^*} = \infty$. Mettre à jour L .
- Les spots $S_{i^*}^{z^*}$ and $S_{j^*}^{z^*+1}$ doivent être reliés. Trois cas peuvent survenir : **(1)** Aucun des deux spots à associer n'a été affecté à une trajectoire partielle. Alors, une nouvelle trajectoire partielle est créée avec ces deux spots. **(2)** Un seul des deux spots à associer a déjà été affecté à une trajectoire partielle. Alors, l'autre spot est rajouté à la trajectoire partielle. **(3)** Les deux spots à associer ont été affectés à deux trajectoires partielles différentes. Alors, ces deux trajectoires partielles sont fusionnées.
- A l'étape précédente, à chaque fois que les cas **(2)** ou **(3)** surviennent, les rayons des zones de recherche circulaires associées à la *queue* et à la *tête* de la trajectoire partielle sont mis à jour en estimant le coefficient de diffusion de la trajectoire.
- Mettre à jour L pour prendre en compte la modification des zones de recherche circulaires.

TAB. 1 – Algorithme de création des trajectoires partielles.

Depuis l'introduction des contours actifs, ou *snakes* [16], elles ont notamment été utilisées pour la détection de contours. Un contour actif est une courbe qui se déforme afin de minimiser, le long de lui-même, une énergie combinant un terme interne (qui régularise la courbe) et un terme externe d'attraction aux données (qui guide la courbe vers certaines caractéristiques de l'image). Etant donnée une courbe initiale, la minimisation de cette énergie conduit souvent à des minima locaux. Pour être moins sensible à ces minima locaux, Cohen et Kimmel [8] ont proposé de modifier cette énergie et, pourvu que les deux extrémités de la courbe soient initialement données, de chercher le minimum global de

$$E(\mathcal{C}) = \int_{\mathcal{C}} \{w + P(\mathcal{C}(s))\} ds = \int_{\mathcal{C}} \tilde{P}(\mathcal{C}(s)) ds \quad (2)$$

où s est l'abscisse curviligne, w un terme de régularisation et P un potentiel positif prenant de faibles valeurs près des caractéristiques d'intérêt de l'image. L'énergie $E(\mathcal{C})$ est similaire à celle des géodésiques [3].

La solution de ce problème de minimisation est obtenue en calculant la surface d'action minimale \mathcal{U} , définie comme l'énergie minimale intégrée le long d'un chemin entre un point de départ p_0 et n'importe quel autre point p :

$$\mathcal{U}(p) = \inf_{\mathcal{C} \in \mathcal{A}_{p_0,p}} E(\mathcal{C}) = \inf_{\mathcal{C} \in \mathcal{A}_{p_0,p}} \left\{ \int_{\mathcal{C}} \tilde{P}(\mathcal{C}(s)) ds \right\}$$

où $\mathcal{A}_{p_0,p}$ est l'ensemble des chemins allant de p_0 à p . Puisque $P > 0$, la surface d'action minimale \mathcal{U} est convexe et admet un seul minimum local : le point de départ p_0 . Le chemin géodésique reliant p_0 à un point p_1 est facilement déduit du calcul de l'action minimale par simple descente de gradient sur \mathcal{U} de p_1 à p_0 , en résolvant :

$$\frac{d\mathcal{C}(s)}{ds}(s) = -\nabla\mathcal{U} \text{ with } \mathcal{C}(0) = p_1 \text{ and } \mathcal{C}(\ell_{\mathcal{C}}) = p_0,$$

où $\ell_{\mathcal{C}}$ désigne la longueur de la courbe \mathcal{C} .

La surface d'action minimale satisfaisant l'équation Eikonale :

$$\|\nabla\mathcal{U}\| = \tilde{P} \text{ and } \mathcal{U}(p_0) = 0, \quad (3)$$

elle peut être efficacement calculée avec l'algorithme de *Fast Marching* [6, 8, 26]. Cet algorithme est particulièrement approprié pour obtenir le chemin minimal entre deux points puisque le calcul de \mathcal{U} sur toute la grille de calcul n'est pas nécessaire. En effet, le chemin minimal reliant p_0 à p_1 peut être déterminé avec l'algorithme de *Fast Marching* en faisant propager simultanément deux fronts à partir de p_0 et p_1 jusqu'à ce qu'ils se rencontrent [5, 7]. Le chemin minimal passe par le point de rencontre des fronts, qui est un point-selle de \mathcal{U} . Ainsi, deux descentes de gradient sur \mathcal{U} depuis le point de rencontre jusqu'à p_0 puis p_1 donnent le chemin minimal recherché (cf. Fig.3).

Cette propriété a été utilisée dans [5] pour reconstruire un ensemble significatif de courbes étant donné un ensemble non structuré de points. Une approche similaire est proposée ici pour trouver les trajectoires partielles à relier et les chemins qui les relient.

3.7 Complétion des trajectoires partielles

Prétraitement. Une fois les trajectoires partielles obtenues, nous les retirons du potentiel afin d'empêcher différents chemins minimaux de suivre les mêmes traces de fluorescence. Le potentiel $\tilde{P} = w + P$ est modifié le long de chaque trajectoire partielle de la manière suivante. Si aucun signal de fluorescence n'avait été enregistré en (x, y, z) , $\tilde{P}_{x,y,z}$ aurait pris une valeur proche de :

$$\tilde{P}_{\text{mod}}(z) = w + \frac{1}{\widehat{c}_L(z) + 1},$$

où $\widehat{c}_L(z)$ est une estimation du fond de l'image $I|_z$. Pour chaque point (x, y, z) appartenant à une trajectoire

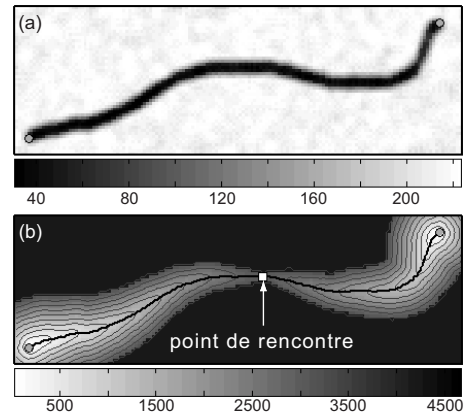


FIG. 3 – (a) Potentiel P . On recherche le chemin minimal reliant les deux points définis en haut à droite et en bas à gauche de l'image. (b) Surface d'action minimale \mathcal{U} obtenue en propageant simultanément deux fronts jusqu'à ce qu'ils se rencontrent. Deux descentes de gradient sur \mathcal{U} à partir du point de rencontre permettent de déterminer le chemin minimal joignant les deux sources.

partielle, nous assignons au potentiel la valeur $\tilde{P}_{\text{mod}}(z)$ à proximité de (x, y, z) . Cette proximité correspond à la taille d'un spot de fluorescence dans une image 2D, donc la modification du potentiel est faite dans un voisinage de taille $M_x \times M_y \times 1$ autour de (x, y, z) .

Contraintes de suivi. Pour obtenir les trajectoires complétées, nous cherchons séquentiellement le chemin minimal joignant la *tête* d'une trajectoire partielle à la *queue* d'une autre. L'ensemble des *têtes* et *queues* de trajectoires partielles constitue un ensemble de sources à partir desquelles des fronts sont simultanément propagés suivant l'équation Eikonale (3). Deux types différents de fronts sont propagés (cf. Fig.4.e) :

- A partir de la *queue* d'une trajectoire partielle, le front est propagé dans la direction descendante (dans la direction des z décroissants).
- A partir de la *tête* d'une trajectoire partielle, le front est propagé dans la direction montante (dans la direction des z croissants).

Si l'on veut que la contrainte de vraisemblance soit satisfaite, le domaine d'influence² de chaque source doit nécessairement être la région de recherche associée à cette source. Par conséquent, chaque propagation de front est restreinte à un domaine paraboloidique défini par (1). De plus, la contrainte d'unicité implique que la *queue* (ou la *tête*) d'une trajectoire partielle ne peut être reliée à plus d'une extrémité d'une autre trajectoire partielle.

Ajout des chemins minimaux. Une *tête* et une *queue* de trajectoires partielles ne peuvent être jointes que si

²Le domaine d'influence d'une source p_0 est l'ensemble des points du domaine de calcul qui peuvent être influencés par p_0 .

leurs fronts se rencontrent avant les autres. Les fronts sont simultanément propagés jusqu'à ce qu'un front montant et un front descendant se rencontrent. Deux descentes de gradient sur \mathcal{U} à partir du point de rencontre donnent le chemin minimal reliant la *tête* d'une trajectoire partielle à la plus proche (au sens d'une distance pondérée) des *queues* des autres trajectoires partielles. Le potentiel \tilde{P} est alors corrigé avec \tilde{P}_{mod} le long du chemin minimal qui vient d'être déterminé. Comme expliqué plus haut, cette correction empêche deux chemins minimaux reliant deux paires différentes de trajectoires partielles de suivre la même trace de fluorescence. Les deux sources qui ont été reliées sont alors retirées de l'ensemble des sources, et la surface d'action minimale \mathcal{U} est mise à jour en retirant les deux fronts qui se sont rencontrés. L'ensemble du processus (descentes de gradient sur \mathcal{U} pour obtenir le chemin minimal, correction de \tilde{P} , mise à jour de \mathcal{U} et propagation des fronts) est itéré tant que des fronts opposés (i.e. fronts descendant et montant) peuvent encore se rencontrer.

Résolution de l'équation Eikonale 3D. Notre approche nécessite de résoudre l'équation Eikonale sur une grille 3D [13]. Les schémas classiques de différences finies ont tendance à diverger et sont instables pour l'équation (3). Rouy et Tourin [22] ont montré que la solution de viscosité correcte u pour $\mathcal{U}_{x,y,z}$ est donnée par le schéma décentré amont suivant :

$$\begin{aligned} & (\max \{u - \mathcal{U}_{x-1,y,z}, u - \mathcal{U}_{x+1,y,z}, 0\})^2 + \\ & (\max \{u - \mathcal{U}_{x,y-1,z}, u - \mathcal{U}_{x,y+1,z}, 0\})^2 + \\ & (\max \{u - \mathcal{U}_{x,y,z-1}, u - \mathcal{U}_{x,y,z+1}, 0\})^2 = \tilde{P}_{x,y,z}. \end{aligned} \quad (4)$$

Le Fast Marching est un algorithme à simple balayage résolvant l'équation Eikonale isotrope de manière efficace, consistante et précise [7, 8, 13, 26, 27]. Pour résoudre (3), les points de la grille sont sélectionnés par valeur croissante de \mathcal{U} . Notons que calculer un chemin minimal par Fast Marching est de même coût que l'algorithme de Dijkstra, qui est une méthode d'ordre $\mathcal{O}(N \log_2 N)$ pour calculer le plus court chemin sur un graphe [14], mais ne souffre pas des erreurs de métrication inhérentes aux algorithmes de graphes appliqués à une grille discrète [8]. L'algorithme de Fast Marching 3D original est détaillé dans la Table 2.

Contraintes sur la propagation de fronts. Quelques améliorations doivent être apportées à l'algorithme de Fast Marching original pour forcer chaque front à se propager dans un domaine paraboloidique, de manière soit montante, soit descendante. Pour chaque point p de la grille où l'action $\mathcal{U}(p)$ a déjà été calculée, on doit savoir de quelle source p dépend. Il est facile de garder trace de la source en générant un index de source \mathcal{S} . Quand $\mathcal{U}(p)$ est mise à jour en résolvant (4), on fait simplement l'affectation $\mathcal{S}(p) = k$, où k l'index de source du voisin (en 6-connexité) de p qui est *Alive* et qui a la plus petite valeur de \mathcal{U} . Alors, pour recevoir une valeur de l'action \mathcal{U} , chaque point de la grille

Définition :

- points *Alive* : points de la grille où la valeur de l'action minimale \mathcal{U} est déterminée et fixée.
- points *Trial* : prochains points de la grille à être examinés pour lesquels la valeur de l'action minimale \mathcal{U} a été estimée en résolvant (4).
- points *Far* : autres points de la grille pour lesquels la valeur de l'action minimale \mathcal{U} n'a pas été estimée.

Initialisation :

- points *Alive* : point de départ p_0 . Assigner $\mathcal{U}(p_0) = 0$.
- points *Trial* : voisins p du point de départ p_0 (en 6-connexité). Assigner $\mathcal{U}(p) = \tilde{P}(p)$.
- points *Far* : autres points q de la grille. Assigner $\mathcal{U}(q) = \infty$.

Boucle :

Tant que l'ensemble des points *Trial* est non-vide, faire :

- Soit p le point *Trial* avec l'action minimale \mathcal{U} la plus faible.
- Enlever p de l'ensemble des points *Trial* pour le mettre dans l'ensemble des points *Alive*.
- Pour chaque voisin q de p (en 6-connexité) qui n'est pas *Alive*, faire :
 - * Mettre à jour $\mathcal{U}(q)$ en résolvant (4).
 - * Si q est *Far*, l'enlever de l'ensemble des points *Far* pour le mettre dans l'ensemble des points *Trial*.

TAB. 2 – Algorithme de Fast Marching 3D.

doit satisfaire la *contrainte paraboloidique*, détaillée dans la Table 3.

Pour vérifier si deux fronts montant et descendant se sont rencontrés à une itération donnée de la boucle de Fast Marching, il suffit de trouver un couple de points voisins qui ont des index de source différents. Alors, une descente de gradient à partir de chacun des deux points permet de déterminer le chemin minimal. La descente de gradient est faite avec une précision subpixelique en utilisant une interpolation trilineaire pour estimer les dérivées avec un schéma de différences finies centré. Pour faire en sorte que la coordonnée z de chaque point du chemin minimal prenne une valeur entière (correspondant à un index d'image), on peut soit adapter localement le pas de descente de gradient, soit reparamétriser le chemin avec une interpolation par splines.

Illustration. La Figure 4 montre un exemple représentatif de notre méthode d'association. Notre approche permet de détecter et compléter les trajectoires de particules en mouvement, même lorsque le signal de fluorescence est très faible ou absent.

4 Résultats expérimentaux

Etudier le mouvement latéral des récepteurs de neurotransmetteurs dans la membrane neuronale est très important pour mieux comprendre le développement et la plasticité des synapses. La glycine est l'un des deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs. Pour illustrer notre méthode, nous présentons ici quelques résultats obtenus en suivant dans la membrane neuronale des récepteurs de la glycine

marqués avec des NCS. Ces résultats sont en partie consultables sur notre site internet³. Les motivations de ces expériences, ainsi que les protocoles utilisés, sont détaillés dans [11].

La Figure 5 montre une représentation 3D des trajectoires des récepteurs de la glycine dans un volume spatio-temporel. Les résultats obtenus à partir de deux séquences différentes d'images de fluorescence sont montrés, révélant la grande hétérogénéité dynamique des récepteurs membranaires.

5 Conclusion

Dans cet article, nous proposons une nouvelle approche pour suivre des objets ponctuels avec des chemins minimaux définis dans un volume spatio-temporel. Peu de paramètres sont requis par l'algorithme, qui est basé sur des modèles réalistes de l'image de fluorescence et des dynamiques moléculaires dans la membrane. Le problème d'appariement de points est résolu avec une approche de groupement perceptuel, procurant une méthode robuste pour déterminer les trajectoires d'émetteurs de fluorescence qui peuvent aléatoirement disparaître et réapparaître dans le champ de vue.

L'application de notre méthode à des données réelles donne des résultats très satisfaisants. Cependant, une évaluation systématique et plus approfondie de l'efficacité de l'algorithme est nécessaire, ainsi qu'une comparaison avec des approches concurrentes. Ce travail est en cours, et les premiers résultats, détaillés dans [2], sont encourageants.

Bien que développée pour suivre des nanocristaux semi-conducteurs, notre méthode peut cependant être appliquée au suivi d'autres particules et se révéler très utile pour le champ de recherche en pleine croissance qu'est aujourd'hui le suivi de molécules uniques.

6 Remerciements

Nous remercions Marie-Virginie Ehrensperger, Sabine Lévi et Antoine Triller.

Références

- [1] S. Bonneau, L. Cohen, and M. Dahan, "A multiple target approach for single quantum dot tracking," in *Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI'04)*, Arlington, VA, USA, Apr. 2004.
- [2] S. Bonneau, M. Dahan, and L. Cohen, "Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume," *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 14, pp. 1384–1395, 2005.
- [3] V. Caselles, R. Kimmel, and G. Sapiro, "Geodesic active contours," *International Journal of Computer Vision*, vol. 22, pp. 61–79, 1997.

Soit s l'index de source du voisin (en 6-connexité) du point (x, y, z) qui est *Alive* et qui a la plus petite valeur d'action \mathcal{U} . Soient (x_s, y_s, z_s) les coordonnées de la source d'index s et D_s le coefficient de diffusion associé à cette source.

Lorsque (x_s, y_s, z_s) est la *queue* d'une trajectoire partielle, (x, y, z) satisfait la contrainte paraboloidique si les deux conditions suivantes sont satisfaites :

$$\begin{cases} \sqrt{(x-x_s)^2 + (y-y_s)^2} & \leq c_\Psi \sqrt{D_s |z-z_s|} \\ z & < z_s \end{cases}$$

Lorsque (x_s, y_s, z_s) est la *tête* d'une trajectoire partielle, (x, y, z) satisfait la contrainte paraboloidique si les deux conditions suivantes sont satisfaites :

$$\begin{cases} \sqrt{(x-x_s)^2 + (y-y_s)^2} & \leq c_\Psi \sqrt{D_s |z-z_s|} \\ z & > z_s \end{cases}$$

TAB. 3 – Contrainte Paraboloidique.

- [4] D. Chetverikov and J. Verestoy, "Feature point tracking for incomplete trajectories," *Computing*, vol. 6, pp. 321–338, 1999.
- [5] L. D. Cohen, "Multiple contour finding and perceptual grouping using minimal paths," *Journal of Mathematical Imaging and Vision*, vol. 14, pp. 225–236, 2001.
- [6] —, "Minimal paths and fast marching methods for image analysis," in *Mathematical Models in Computer Vision : The Handbook*, N. Paragios, Y. Chen, and O. Faugeras, Eds. Springer, 2005.
- [7] L. D. Cohen and T. Deschamps, "Grouping connected components using minimal path techniques," in *Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'01)*, Kauai, Hawaii, Dec. 2001.
- [8] L. D. Cohen and R. Kimmel, "Global minimum for active contour models : a minimal path approach," *International Journal of Computer Vision*, vol. 24, pp. 57–78, 1997.
- [9] I. J. Cox, "A review of statistical data association techniques for motion correspondence," *International Journal of Computer Vision*, vol. 10, pp. 53–66, 1993.
- [10] I. J. Cox and S. L. Hingorani, "An efficient implementation of Reid's multiple hypothesis tracking algorithm and its evaluation for the purpose of visual tracking," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 18, pp. 138–150, 1996.
- [11] M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller, "Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single quantum dot tracking," *Science*, vol. 302, pp. 442–445, 2003.
- [12] A. P. Dempster, N. M. Laird, and D. B. Rubin, "Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm," *Journal of the Royal Statistical Society*, vol. 39 (Series B), pp. 1–38, 1977.

³www.lkb.ens.fr/recherche/optetbio/image/index.htm.

- [13] T. Deschamps and L. D. Cohen, "Fast extraction of minimal paths in 3D images and applications to virtual endoscopy," *Medical Image Analysis*, vol. 5, pp. 281–299, 2001.
- [14] E. W. Dijkstra, "A note on two problems in connection with graphs," *Numerische Mathematic*, vol. 1, pp. 269–271, 1959.
- [15] A. Genovesio, B. Zhang, and J. Olivo-Marin, "Tracking of multiple fluorescent biological objects in three dimensional video microscopy," in *Proceedings of the 2003 International Conference on Image Processing (ICIP'03)*, Barcelona, Spain, Sept. 2003.
- [16] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos, "Snakes : active contour models," *International Journal of Computer Vision*, vol. 1, pp. 321–331, 1988.
- [17] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, and D. J. Nesbitt, "Nonexponential blinking kinetics of single CdSe quantum dots : A universal power law behavior," *Journal of Chemical Physics*, vol. 112, pp. 3117–3120, 2000.
- [18] Q. Lin, "Enhancement, detection, and visualization of 3D volume data," Ph.D. dissertation, Dept. EE, Linköping University, Sweden, 2003.
- [19] J. Lippincott-Schwartz and G. H. Patterson, "Development and use of fluorescent protein markers in living cells," *Science*, vol. 300, pp. 87–91, 2004.
- [20] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics," *Science*, vol. 307, pp. 538–544, 2005.
- [21] D. B. Reid, "An algorithm for tracking multiple targets," *IEEE Transactions on Automatic Control*, vol. 24, pp. 843–856, 1979.
- [22] E. Rouy and A. Tourin, "A viscosity solution approach to shape from shading," *SIAM Journal on Numerical Analysis*, vol. 29, pp. 867–884, 1992.
- [23] M. J. Saxton, "Single particle tracking : the distribution of diffusion coefficients," *Biophysical Journal*, vol. 72, pp. 1744–1753, 1997.
- [24] M. J. Saxton and K. Jacobson, "Single particle tracking : applications to membrane dynamics," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 26, pp. 373–399, 1997.
- [25] I. K. Sethi and R. Jain, "Finding trajectories of feature points in a monocular image sequence," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 9, pp. 53–73, 1987.
- [26] J. A. Sethian, "Fast marching methods," *SIAM Review*, vol. 41, pp. 199–235, 1999.
- [27] —, *Level Set Methods and Fast Marching Methods*. Cambridge University Press, 1999.
- [28] J. L. Starck, A. Bijaoui, I. Valtchanov, and F. Murtagh, "A combined approach for object detection and deconvolution," *Astronomy and Astrophysics Suppl. Ser.*, vol. 147, pp. 139–149, 2000.
- [29] D. Thomann, D. R. Rines, P. K. Sorger, and G. Danuser, "Automatic fluorescent tag detection in 3d with super-resolution : application to the analysis of chromosome movement," *Journal of Microscopy*, vol. 208, pp. 49–64, 2002.
- [30] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, "Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes," *Biophysical Journal*, vol. 82, pp. 2775–2783, 2002.
- [31] W. Tvarusko, M. Bentele, T. Misteli, R. Rudolf, C. Kaether, D. L. Spector, H. H. Gerdes, and R. Eils, "Time-resolved analysis and visualization of dynamic processes in living cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 96, pp. 7950–7955, 1999.
- [32] C. J. Veenman, M. J. T. Reinders, and E. Backer, "Resolving motion correspondence for densely moving points," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 23, pp. 54–72, 2001.

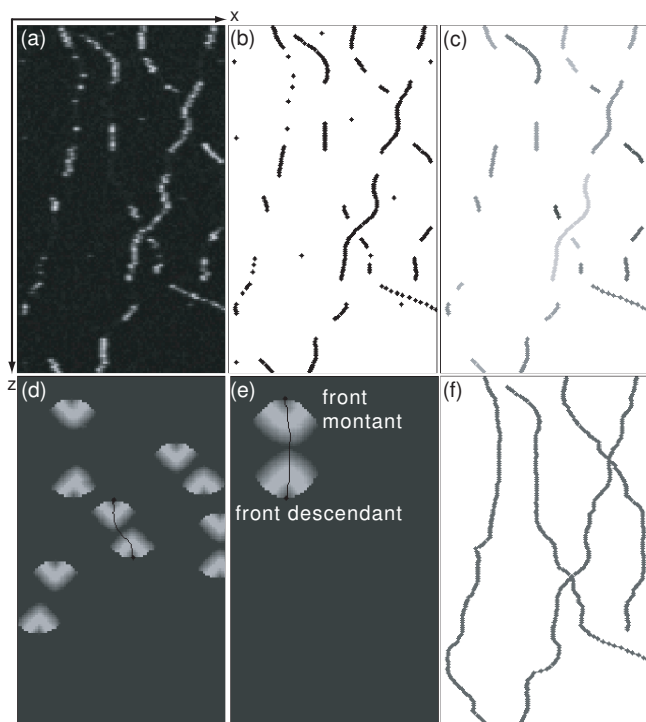


FIG. 4 – Illustration du processus d'association. Le mouvement de quatre particules browniennes fluorescentes a été simulé le long d'une même ligne d'une séquence d'images synthétiques. Chaque image représente une vue en coupe montrant le plan xz dans lequel le mouvement survient. (a) Image de fluorescence montrant les traces de fluorescence des quatre particules. (b) Nuages de points obtenus après l'étape de détection. (c) Trajectoires partielles obtenues en reliant les spots détectés dans des images consécutives de la séquence. (d)-(e) Surface d'action minimale \mathcal{U} obtenue à différentes itérations. (h) Trajectoires complétées obtenues en reliant les trajectoires partielles par des chemins minimaux.

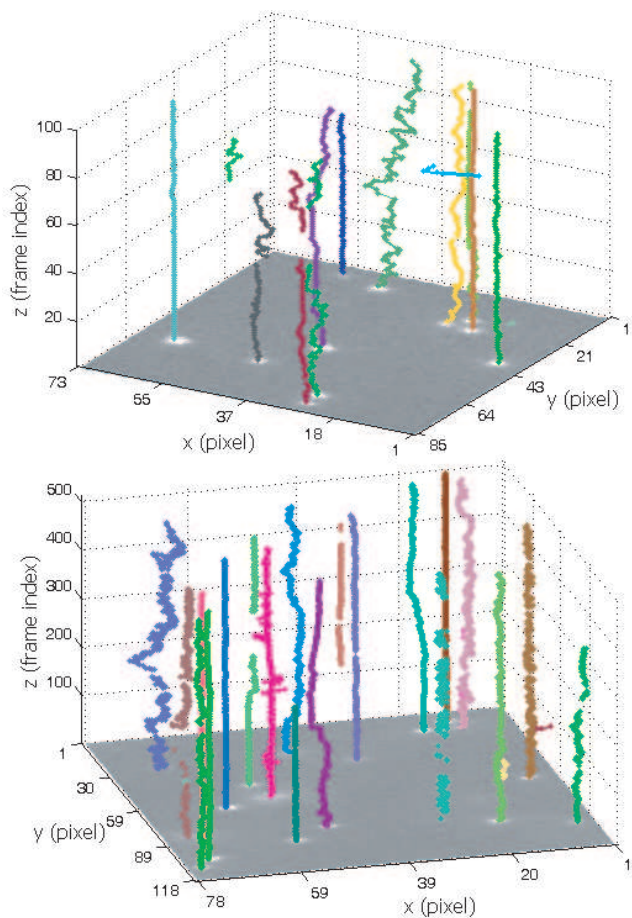


FIG. 5 – Représentation 3D des trajectoires des récepteurs de la glycine dans un volume spatio-temporel. Pour chaque séquence d'images, la taille d'un pixel est $p_w = 216.7\text{nm}$ et la période d'échantillonnage temporel $t_s = 75\text{ms}$. Le mouvement de récepteurs individuels est clairement observable sur plusieurs dizaines de secondes, avec une résolution spatiale de quelques nanomètres. Malgré le clignotement des NCS, qui se caractérise par l'interruption brutale de certaines trajectoires, notre approche permet d'automatiquement reconstruire chaque mouvement individuel.