



HAL
open science

Estimation dans le modèle d'empilement avec application aux mesures de la fluorescence résolue en temps

Tabea Rebafka

► **To cite this version:**

Tabea Rebafka. Estimation dans le modèle d'empilement avec application aux mesures de la fluorescence résolue en temps. Traitement du signal et de l'image [eess.SP]. Télécom ParisTech, 2009. Français. NNT : 2009ENST0018 . pastel-00005715

HAL Id: pastel-00005715

<https://pastel.hal.science/pastel-00005715>

Submitted on 19 May 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Doctorale
d'Informatique,
Télécommunications
et Électronique de Paris



THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE TÉLÉCOM PARISTECH
SPÉCIALITÉ : SIGNAL ET IMAGES

TABEA REBAFKA

ESTIMATION DANS LE MODÈLE D'EMPILEMENT AVEC
APPLICATION AUX MESURES DE LA FLUORESCENCE
RÉSOLUE EN TEMPS

SOUTENUE LE 23 OCTOBRE 2009 DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

| | |
|---------------------|-----------------------|
| CHRISTOPHE AMBROISE | RAPPORTEUR |
| TOBIAS RYDÉN | RAPPORTEUR |
| ELISABETH GASSIAT | PRÉSIDENTE DU JURY |
| ERIC MOULINES | EXAMINATEUR |
| ANTOINE SOULOUMIAC | CO-ENCADRANT DE THÈSE |
| FRANÇOIS ROUEFF | DIRECTEUR DE THÈSE |

CONTENTS

| | |
|--|------------|
| Remerciements | v |
| Abstract | vii |
| Résumé | ix |
| 1 Introduction | 1 |
| 1.1 Principes des durées de vies de fluorescence | 2 |
| 1.1.1 Phénomène physique de la fluorescence | 2 |
| 1.1.2 Spectroscopie de fluorescence | 8 |
| 1.2 Définition du modèle d’empilement | 15 |
| 1.3 Quelques méthodes d’analyse des mesures TCSPC | 18 |
| 1.3.1 Analyse en absence d’effet d’empilement | 18 |
| 1.3.2 Analyse en présence de l’effet d’empilement | 20 |
| 1.4 Inégalités d’information sur les paramètres du modèle | 21 |
| 1.5 Modèles de mélange de distributions | 22 |
| 1.5.1 Identifiabilité des modèles de mélange | 23 |
| 1.5.2 Estimation dans des modèles de mélange fini | 24 |
| 1.5.3 Estimation dans des modèles de mélange infini | 26 |
| 1.6 Principaux résultats de la thèse | 29 |
| 1.6.1 Etude de l’information dans le modèle d’empilement | 29 |
| 1.6.2 Estimation paramétrique basée sur la vraisemblance | 30 |
| 1.6.3 Estimation non paramétrique par des séries orthogonales | 31 |
| 1.6.4 Publications | 31 |
| 2 Information Bounds for the Pile-up Model and an Efficient Gibbs Sampler | 33 |
| 2.1 Regularity of the Pile-up Model | 34 |
| 2.2 The Effect of Pile-up on Information Bounds | 36 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.2.1 | Fisher Information of λ | 38 |
| 2.2.2 | Asymptotic Behavior for Small λ in the Poisson Case | 39 |
| 2.2.3 | Scale Family | 40 |
| 2.2.4 | Exponential Case | 41 |
| 2.2.5 | Multi-Exponential Case | 46 |
| 2.3 | Gibbs Sampler for the Multi-Exponential Pile-up Model | 46 |
| 2.3.1 | Gibbs Sampling Algorithm | 47 |
| 2.3.2 | Convergence Control Tool | 50 |
| 2.4 | Experimental Results of the Gibbs Sampler | 53 |
| 2.4.1 | Comparison with the Cramér-Rao Bound | 53 |
| 2.4.2 | Variance Reduction | 55 |
| 2.4.3 | Comparison to the Coates Method | 55 |
| 2.5 | Discussion | 57 |
| 2.6 | Proofs | 60 |
| 3 | Corrected Maximum Likelihood Estimator | 67 |
| 3.1 | General Setting and Notation | 68 |
| 3.2 | Estimation Method | 69 |
| 3.2.1 | Corrected Likelihood | 69 |
| 3.2.2 | Maximization by the EM Algorithm | 71 |
| 3.3 | Asymptotic Behavior | 72 |
| 3.3.1 | Consistency | 73 |
| 3.3.2 | Limit Distribution | 75 |
| 3.4 | Evaluation of the Performance of the Corrected MLE | 79 |
| 3.4.1 | EM Algorithm in the TCSPC Context | 80 |
| 3.4.2 | Application to Fluorescence Measurements | 81 |
| 3.4.3 | Reduction of the Acquisition Time | 82 |
| 3.4.4 | Technical Constraints of TCSPC | 86 |
| 3.4.5 | Comparison to the Coates Correction | 91 |
| 3.4.6 | Nonparametric Maximum Likelihood Estimator | 91 |
| 3.5 | Discussion | 97 |
| 3.6 | Proofs | 99 |
| 4 | Minimax Estimation of the Mixing Density of an Infinite Mixture | 103 |
| 4.1 | Estimation Method | 103 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.1.1 | Orthogonal Series Estimator | 104 |
| 4.1.2 | Examples | 105 |
| 4.2 | Analysis of the Orthogonal Series Estimator | 107 |
| 4.2.1 | Bias, Variance and MISE | 108 |
| 4.2.2 | Upper Bound of the MISE | 109 |
| 4.2.3 | Lower Bounds of the Minimax Risk | 110 |
| 4.2.4 | Minimax Rate for Exponential Mixtures | 112 |
| 4.3 | Numerical study | 112 |
| 4.4 | Orthogonal Series Estimator in the Pile-up Model | 116 |
| 4.4.1 | Adaption to the Pile-up Model | 116 |
| 4.4.2 | Numerical Study | 117 |
| 4.5 | Discussion | 119 |
| 4.6 | Proofs | 120 |
| A | Proof of the Information Bound | 129 |
| B | Central Limit Theorem for L-Statistics | 131 |
| B.1 | Introduction | 131 |
| B.2 | General Central Limit Theorem for L -statistics | 132 |
| B.3 | Central Limit Theorem in the Pile-up Model | 138 |
| C | Brevet d'invention | 141 |
| C.1 | Abrégé descriptif | 141 |
| C.2 | Description de l'invention | 141 |
| C.3 | Revendications du brevet | 158 |
| | Bibliography | 161 |

REMERCIEMENTS

Mes vifs remerciements vont tout d'abord à mon directeur de thèse François Roueff. Il m'est difficile de résumer en quelques mots tout ce qu'il m'a apporté par son implication tout au long de ma thèse. Au delà de ses multiples compétences scientifiques et de son excellente capacité pédagogique, son écoute, sa patience et son soutien infaillible tout le long de ce travail de thèse, ont été déterminants. Il a été un directeur de thèse attentionné et disponible. Je le remercie sincèrement d'avoir cru en moi et de la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie également Antoine Souloumiac à qui revient le sujet intéressant et stimulant de cette thèse qui est la fluorescence résolue en temps, et qui a assuré mon encadrement au CEA. Son vif intérêt pour les applications a été d'un très grand apport. Je le remercie pour les démarches d'accueil au sein du CEA à Saclay.

Je remercie tout spécialement Christophe Ambroise, professeur à l'Université d'Evry, et Tobias Rydén, professeur à l'Université de Lund, de l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ma thèse en acceptant d'être rapporteurs. Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury de m'avoir fait l'honneur de participer à ma soutenance et de s'être penché de près sur mon travail; en particulier Elisabeth Gassiat, professeur à l'Université Paris-Sud, et Eric Moulines, professeur à Télécom ParisTech.

Mes remerciements vont aux membres du laboratoire LPSS au CEA, et de l'ancien LETS, pour m'avoir permis de travailler à ma thèse dans d'excellentes conditions. Je remercie également l'ensemble du personnel de l'équipe STA au département TSI à Télécom ParisTech, pour m'avoir accueilli pendant ces trois années et pour les nombreux conseils tout au long de ma thèse.

Je dis un grand merci du fond du cœur à tous les doctorants au TSI. J'ai passé des innombrables joyeux moments avec vous et j'ai toujours trouvé du soutien moral auprès de vous. Je vous dois beaucoup. Dorothee, en toi j'ai trouvé une amie comme on n'en a pas beaucoup. Merci de ton amitié. Enfin, je ne remercierai jamais assez Jean-Baptiste. Je ne trouve pas les mots pour te dire combien tu comptes pour moi. Merci infiniment d'être à mes côtés et surtout, merci d'être ce que tu es. Je réserve le plus grand des mercis à mes parents ainsi qu'à ma sœur et mes frères pour leur soutien inconditionnel.

ABSTRACT

In this thesis the so-called pile-up model is studied and estimators for this model are constructed and analyzed in a parametric and a nonparametric set-up. An observation of the pile-up model is the minimum of a random number of independent variables from the target distribution. The distribution of the pile-up model results from a nonlinear distortion of the target distribution, to which we refer as the pile-up effect. The goal is to recover the target distribution from observations of the pile-up model in spite of the distortion

The pile-up model is motivated by the TCSPC application in time-resolved fluorescence, where the extent of the pile-up distortion depends directly on the laser intensity which is tuned by the user. We conduct a study of the Cramér-Rao bound to determine the best choice of the intensity. In the case where the target distribution belongs to a scale family, as for example the family of exponential distributions, we show that the Cramér-Rao bound is minimal at some point that is the same for any target distribution of this scale family. As this uniform point of minimum is determined numerically, this result allows tuning the laser intensity in an optimal way.

The estimation of the parameters of the target distribution is generally rather difficult due to the involved form of the pile-up density. In this thesis we propose a Gibbs sampler that is well adapted to the pile-up model and that is based on a new scheme of missing variables. Simulations show that this Gibbs sampler is efficient for any intensity.

Using a maximum likelihood approach an alternative estimator is developed based on a new contrast. The consistency and the limit distribution of the estimator are established. Therefore, a central limit theorem for L -statistics is provided. The complexity of computing the estimator is generally the same as the one of the classical maximum likelihood estimator in the target model. In particular, if the EM algorithm applies to the target model, then an EM type algorithm can be used to compute the proposed estimator. A comparison with the current practice in fluorescence shows that a reduction of the variance of an order of magnitude can be achieved by applying the new estimator on observations of the pile-up model.

Finally, we consider the problem of estimating the mixing density of an infinite exponential mixture in a nonparametric set-up. We propose an orthogonal series estimator by estimating the coefficients of the series expansion of the mixing density. We derive minimax upper and lower bounds of the mean integrated squared error which apply in various contexts. It is shown that the orthogonal series estimator achieves the minimax rate on some specific smoothness spaces. We also adapt the estimator to the pile-up model, when the target density is an infinite exponential mixture.

RÉSUMÉ

Dans cette thèse le modèle d'empilement est étudié et des estimateurs pour ce modèle sont développés et analysés dans un cadre paramétrique et non paramétrique. Une observation du modèle d'empilement est donnée par le minimum d'un nombre aléatoire de variables indépendantes distribuées selon la loi initiale. La distribution du modèle d'empilement est le résultat d'une distorsion non linéaire de la loi initiale, connu sous le nom d'effet d'empilement. L'objectif est d'identifier la loi initiale à partir des observations du modèle d'empilement malgré la distorsion.

Le modèle d'empilement est motivé par l'application TCSPC en fluorescence résolue en temps, où l'ampleur de l'effet d'empilement dépend directement de l'intensité du laser qui est sélectionnée par l'utilisateur. Nous étudions la borne de Cramér-Rao pour déterminer le meilleur choix de l'intensité. Dans le cas où la loi initiale appartient à une *scale family*, comme par exemple la famille des lois exponentielles, nous montrons que la borne de Cramér-Rao est minimale à un point qui est le même pour toute loi initiale dans cette *scale family*. Comme ce minimum est déterminé numériquement, ce résultat permet en pratique de régler l'intensité du laser de manière optimale.

L'estimation du paramètre de la loi initiale est généralement difficile, car la densité empilée est de forme complexe. Dans cette thèse, nous proposons un échantillonneur de Gibbs qui est bien adapté au modèle d'empilement et qui est basé sur un nouveau schéma de variables manquantes. Des simulations montrent que l'échantillonneur de Gibbs est efficace pour toute intensité.

Par une approche de maximum de vraisemblance, nous développons un estimateur alternatif basé sur un nouveau contraste. La consistance ainsi que la loi limite de cet estimateur sont établies. Dans ce cadre, nous proposons un nouveau théorème limite central pour des L -statistiques. La complexité de calcul de cet estimateur est généralement la même que celle de l'estimateur du maximum de vraisemblance associée au modèle initial. En particulier, si l'algorithme E.M. s'applique au modèle initial, alors on peut utiliser un algorithme E.M. modifié pour calculer l'estimateur ici proposé. Une comparaison avec la pratique actuelle en fluorescence montre qu'une réduction de la variance de l'estimateur d'un facteur 10 est envisageable en appliquant le nouvel estimateur sur des observations empilées.

Finalement, nous considérons le problème d'estimation de la densité mélangeante d'un mélange infini de lois exponentielles dans un cadre non paramétrique. Nous proposons un estimateur par projection en estimant les coefficients de la série orthogonale représentant la densité mélangeante. Nous développons des bornes supérieures de l'erreur quadratique intégrée moyenne et des bornes inférieures du risque minimax qui s'appliquent dans des contextes variés. Nous montrons que l'estimateur par projection est optimal dans le sens que l'erreur quadratique intégrée moyenne atteint la vitesse minimax dans des espaces de régularité bien choisis. Nous adaptons aussi cet estimateur au modèle d'empilement, lorsque la loi initiale est un mélange infini de lois exponentielles.

CHAPTER 1

INTRODUCTION

Lorsqu'un échantillon contient des observations perturbées, censurées ou manquantes, l'inférence statistique peut être difficile, car la *distribution initiale* n'est pas observée directement. Cette thèse porte sur l'étude d'un nouveau modèle statistique qui est caractérisé par des données manquantes, et sur la construction de nouveaux estimateurs. Ce nouveau modèle est appelé le *modèle d'empilement*. Dans ce modèle une observation est définie comme le minimum d'un nombre aléatoire de variables indépendantes distribuées selon la loi initiale. La distribution du modèle d'empilement est alors le résultat d'une distorsion non linéaire de la distribution initiale. Cette distorsion est connue sous le nom d'*effet d'empilement*. L'objectif est alors d'identifier la distribution initiale à partir des données du modèle d'empilement malgré la distorsion. Ce problème d'estimation s'apparente alors à un problème inverse. En raison de la forme complexe de la distribution empilée, des estimateurs standards comme l'estimateur du maximum de vraisemblance ou par la méthode des moments sont infaisables.

Le modèle d'empilement est motivé par une application en fluorescence résolue en temps, en l'occurrence par la technique *time-correlated single photon counting* (TCSPC). Suivant le mode opératoire, le TCSPC fournit des observations distribuées selon la loi initiale ou selon un modèle d'empilement. L'avantage du second mode réside dans le fait que le nombre d'observations réalisées dans un certain laps de temps est beaucoup plus élevé que dans le premier. En construisant des estimateurs adaptés à l'effet d'empilement, nous permettrons l'acquisition des données dans le second mode opératoire de TCSPC, et, par suite, le temps d'acquisition des données se verrait raccourci.

Afin de motiver l'étude statistique du modèle d'empilement, nous présentons dans ce chapitre introductif le domaine d'application. Le phénomène de fluorescence est d'abord brièvement exposé et quelques applications mettent en évidence l'importance des *durées de vie de fluorescence* en science, notamment en chimie, biologie et médecine. Une description de la méthode TCSPC, qui est une des techniques standards de mesure de durées de vie de fluorescence, permet de comprendre le modèle statistique de mesures ainsi que l'origine de l'effet d'empilement. Puis suit la définition mathématique du modèle d'empilement ainsi qu'une présentation des méthodes d'analyses existantes en TCSPC. Nous rappelons ensuite des inégalités d'information ainsi que quelques aspects mathématiques des modèles de mélange fini et infini jouant un rôle majeur dans cette thèse. Le présent chapitre s'achève par un résumé des résultats principaux obtenus dans cette thèse. Ces résultats seront détaillés en détail dans les chapitres structurant ce manuscrit.

1.1 PRINCIPES DES DURÉES DE VIES DE FLUORESCENCE

La *fluorescence moléculaire* est l'émission d'un photon lorsqu'une molécule excitée retourne à son état fondamental. Ce phénomène physique est connu depuis bien longtemps avant les travaux de Stokes. En effet, le terme *fluorescence* a été introduit par Stokes en 1852 dans une description du minéral fluorine qui émet de la lumière visible à la suite de l'éclairement avec des rayons ultraviolets invisibles (Stokes, 1852). La fluorescence est un phénomène très répandu comme en témoignent de nombreux composés naturels ou synthétiques qui émettent des photons de fluorescence sous des conditions convenables.

Outre l'intensité de fluorescence, la longueur d'onde d'émission et le rendement quantique, une des caractéristiques les plus importantes de la fluorescence est la *durée de vie de fluorescence*. Elle est définie comme le temps entre l'excitation de la molécule et l'émission d'un photon de fluorescence. Les durées de vie de fluorescence dépendent non seulement de la molécule émissive, mais aussi de son milieu physique environnant et des interactions avec d'autres molécules, sont une source riche d'information sur les processus moléculaires. De ce fait, elles sont devenues un outil d'étude précieux de systèmes chimiques et biologiques. Les durées de vie peuvent, par exemple, servir à étudier les interactions de deux protéines, à mesurer des distances intramoléculaires ou à analyser le changement conformationnel d'une molécule. D'ailleurs, le nombre d'applications des durées de vie de fluorescence dans des domaines de la biologie, chimie et médecine ne cesse de croître (Raicu & Popescu, 2008; Jiskoot *et al.*, 2005; Bruns *et al.*, 2007).

En raison de la très courte échelle temporelle de la fluorescence, la détermination de durées de vie de fluorescence est un challenge technique. Plusieurs méthodes de mesure existent en pratique. Nous présenterons les principes de deux des plus répandues : la *fluorimétrie de phase* et la *fluorimétrie impulsionnelle*, encore appelé le TCSPC. Mais avant présentons le phénomène physique rattaché à la fluorescence.

1.1.1 PHÉNOMÈNE PHYSIQUE DE LA FLUORESCENCE

Pour une meilleure compréhension du phénomène physique de la fluorescence, il est utile de regarder les processus ayant lieu au niveau de la mécanique quantique. Ils mettent en évidence que les caractéristiques de la fluorescence dépendent du milieu chimique et physique de la molécule fluorescente ainsi que des interactions avec les molécules environnantes. Cette forte sensibilité est à l'origine du rôle de sonde que peut jouer la fluorescence apportant ainsi des informations sur le microenvironnement de la molécule émissive et la dynamique moléculaire. Quelques applications seront présentées pour illustrer la polyvalence de la fluorescence. Pour des notions approfondies sur la fluorescence et ses diverses applications nous renvoyons aux ouvrages de Valeur (2002, 2004) et de Lakowicz (1999).

Composés fluorescents

Tout composé capable d'émettre de photons de fluorescence est un *fluorophore*. On distingue les fluorophores *intrinsèques* naturellement présents, comme le tryptophane, la quinine et la tyrosine, et les fluorophores *extrinsèques* utilisés pour marquer des molécules non fluorescentes. Pour

l'étude des processus moléculaires, les fluorophores intrinsèques sont idéaux, mais malheureusement très rares. Pourtant, il est possible d'attacher des fluorophores extrinsèques, comme la fluorescéine, la rhodamine ou l'érythrosine, à des molécules non fluorescentes par une simple réaction chimique.

Le marquage par fluorophores est extrêmement utile. Il permet, par exemple, de tracer des molécules dans un organisme vivant, ce qui est essentiel pour la compréhension du métabolisme. Autrefois, l'utilisation d'étiquettes radioactives était courante. Mais en raison des coûts prohibitifs et de l'obligation du maniement délicat de substances radioactives, les fluorophores les ont rapidement supplantés. La détection de molécules étiquetées par des fluorophores est très précise et quantifiable. De plus, la fluorescence est beaucoup moins nuisible pour l'organisme que la radioactivité.

Le fluorophore le plus célèbre est certainement la *protéine fluorescente verte* (souvent abrégé GFP, de l'anglais *Green Fluorescent Protein*). En 2008 Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien ont été couronnés du prix Nobel de chimie pour la découverte et les applications de la GFP. La GFP est un marqueur versatile beaucoup utilisé en biologie cellulaire, car offrant la facilité de liaison aux protéines spécifiques ou du transport à l'intérieur de cellules. Il est même possible de stimuler directement la production de GFP par les cellules mêmes. Grâce à la microscopie de fluorescence, la GFP apporte des informations spatiales et temporelles sur la localisation des protéines dans les cellules. La connaissance de l'évolution temporelle et spatiale des protéines étiquetées a redéfini la compréhension de beaucoup de processus biologiques, dont le repliement et le transport de protéines et la dynamique de l'acide ribonucléique (ARN). Par ailleurs, classée inoffensive pour les eucaryotes, la GFP est appropriée pour l'utilisation *in vivo*, c'est-à-dire sur l'organisme vivant.

Mécanique quantique

La fluorescence est une luminescence typiquement des corps froids. A la suite de l'excitation lumineuse, la molécule peut se désexciter en émettant un photon de fluorescence. Nous regardons maintenant les processus de mécanique quantiques mis en jeu, afin de mieux comprendre le phénomène de la fluorescence.

L'*absorption* d'un photon incident par la molécule porte un de ces électrons de l'*état fondamental* (l'état électronique avec le moins d'énergie) à un *état excité* (état électronique avec plus d'énergie qu'à l'état fondamental). Mais comme les états excités sont instables, la molécule retourne à l'état fondamental après un laps de temps en libérant de l'énergie. Plusieurs voies de désexcitation sont possibles parmi lesquelles la fluorescence, qui consiste en l'*émission* d'un photon.

Les transitions entre les états électroniques sont souvent illustrés par un *diagramme de Jabłoński*, voir Figure 1.1. L'état singulet fondamental et le premier et deuxième état singulet excité sont dénotés S_0 , S_1 , S_2 , respectivement. Dans chacun de ces états électroniques, l'électron peut résider dans divers niveaux énergétiques vibrationnels, ici dénotés 0, 1, 2. Les transitions entre les états sont représentées par des flèches verticales pour indiquer leur nature instantanée.

L'absorption a généralement lieu à partir du niveau vibrationnel le plus bas de l'état fondamental. Puisque la différence d'énergie entre S_0 et S_1 est trop grande pour une excitation par la chaleur, on utilise alors la lumière pour induire de la fluorescence. L'absorption de la lumière engendre plusieurs processus. En général, un fluorophore est d'abord porté dans l'un des niveaux

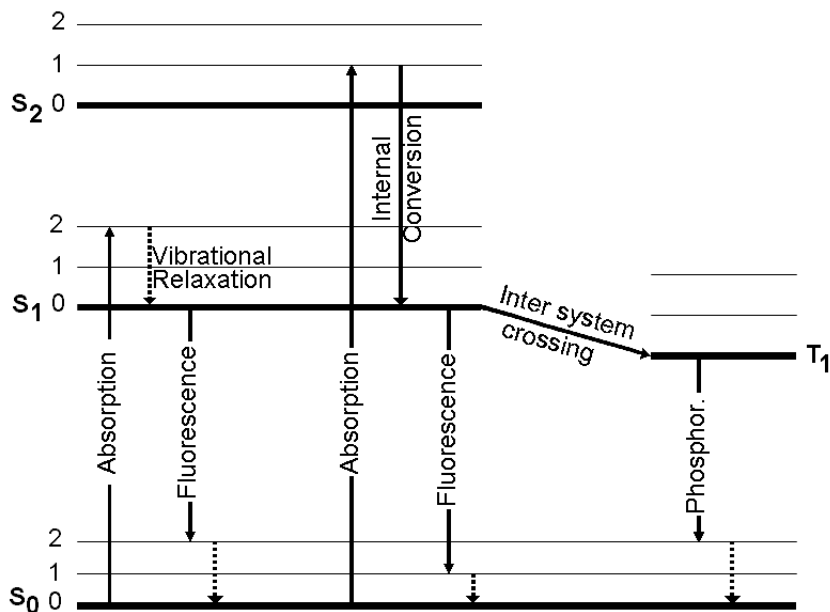


Figure 1.1: Diagramme de Jabłoński. Illustration des transitions entre les états électroniques.

vibrationnels élevés de S_1 ou S_2 , puis assez rapidement la molécule est conduite vers le plus bas niveau vibrationnel de l'état excité S_1 . Cette transition, dite *conversion interne* ou *relaxation vibrationnelle*, est invisible parce qu'il n'y a pas d'émission de photons. Par conséquent, la fluorescence se produit généralement à partir du plus bas niveau vibrationnel de S_1 . Lors de l'émission d'un photon de fluorescence, la molécule est conduite vers un niveau vibrationnel élevé de l'état fondamental. Ensuite, elle retourne au niveau vibrationnel le plus bas par relaxation vibrationnelle invisible.

En raison de la perte d'énergie lors de la conversion interne et des relaxations vibrationnelles, la longueur d'onde du photon de fluorescence est typiquement moins énergétique, et donc plus longue, que celle de la lumière excitante. La différence d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis est transformée en rotation moléculaire, vibration ou chaleur. Ceci explique le phénomène que Stokes a observé en 1852 : la fluorine émet de la lumière bleue visible après excitation par des rayons ultraviolets plus énergétiques et invisibles. En pratique, cette différence de longueurs d'onde permet de séparer les photons de fluorescence de la lumière incidente excitatrice.

La différence de longueurs d'onde est particulièrement visible dans les données spectrales de la fluorescence, où on constate un déplacement du spectre d'émission vers le rouge comparé au spectre d'absorption. Un *spectre d'émission de fluorescence* est un diagramme qui représente l'intensité de fluorescence par rapport à la longueur d'onde d'émission. Le *spectre d'absorption* montre la part de photons incidents absorbés par la molécule par rapport à la longueur d'onde de la lumière incidente. A titre d'illustration la Figure 1.2 montre le spectre d'absorption et d'émission de la quinine. L'écart entre le maximum du spectre d'absorption et le maximum du spectre d'émission est appelé le *déplacement de Stokes*. Il représente l'énergie qui est perdue pendant l'excitation et la désexcitation de la molécule.

La forme du spectre d'émission peut varier énormément selon la structure chimique du fluorophore et la solution dans laquelle la molécule est dissoute. En général, l'émission de fluores-

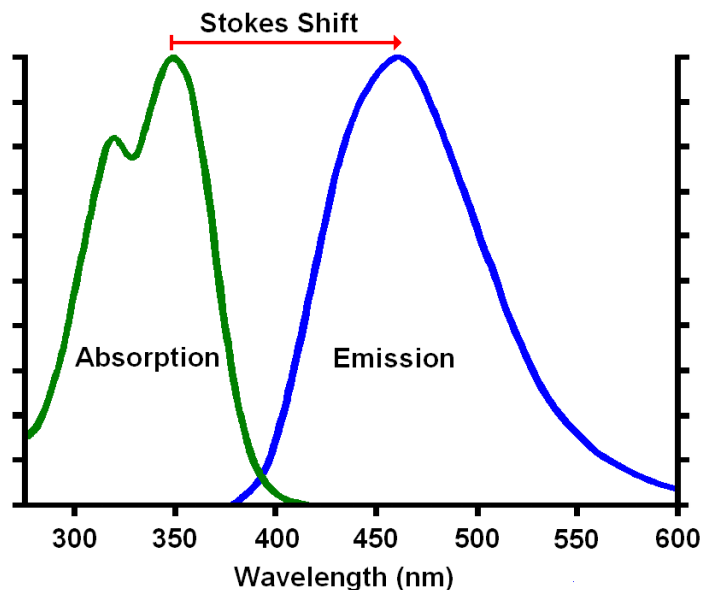


Figure 1.2: Spectre d'absorption et d'émission de fluorescence de sulfate de quinine dihydraté dans de l'acide sulfurique 0.5 M.

cence est comprise entre 250 à 900 nm, ce qui correspond à la lumière ultraviolette, visible et infrarouge. A cause du déplacement de Stokes, la longueur d'onde d'excitation est plus courte que la longueur d'onde d'émission. Néanmoins, le spectre d'émission est généralement indépendant de la longueur d'onde d'excitation, car la fluorescence a typiquement lieu à partir du plus bas niveau vibrationnel de l'état S_1 .

Il est important de souligner que la fluorescence n'est pas l'unique voie de désexcitation pour retourner à l'état fondamental. Il y a plusieurs formes de désexcitation invisible comme le transfert de l'énergie à une autre molécule, le retour à l'état fondamental via la conversion interne ou la perte de l'énergie lors de la collision avec une autre molécule. En plus, selon la molécule et l'environnement physicochimique, la fluorescence rivalise avec la phosphorescence, un autre processus de désexcitation visible. On appelle *phosphorescence* l'émission d'un photon quand la molécule excitée se trouve dans un état triplet et non dans un état singulet comme pour la fluorescence. Plus précisément, l'absorption d'un photon porte la molécule dans un état singulet excité, il s'ensuit un processus dit *passage intersystème* où la molécule excitée passe dans un autre état électronique excité d'une multiplicité de spin plus élevée. Ensuite, le retour de l'état triplet vers l'état fondamental peut être accompagné par l'émission d'un photon de phosphorescence, voir Figure 1.1.

Durées de vie de fluorescence

Comme susmentionnée, la fluorescence est en compétition avec de nombreux autres processus moléculaires comme des interactions avec des molécules avoisinantes ou des processus de désexcitation non radiatifs. Le *rendement quantique de fluorescence* mesure l'efficacité relative de la fluorescence par rapport aux autres processus non radiatifs. Il est défini comme la part de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental S_0 avec émission de photons de fluorescence. Le

rendement quantique est ainsi d'autant plus élevé que la fluorescence est la voie de désexcitation préférée, c'est le cas lorsque la fluorescence est plus rapide que les processus alternatifs. Puisqu'un seul photon absorbé ne peut causer l'émission que d'un seul photon, le rendement quantique est toujours inférieur ou égal à 1.

Le *déclin de fluorescence* $I(t)$ décrit l'évolution temporelle de la concentration de molécules fluorescentes dans l'état excité depuis le moment d'excitation. En général, le déclin de fluorescence d'une molécule est exponentiel, de forme $I(t) = ae^{-t/\tau}$ où a est une constante réelle et la constante de temps τ , appelée la *durée de vie de fluorescence* de la molécule, représente la durée moyenne de séjour de la molécule dans un état excité avant son retour à l'état fondamental par émission d'un photon de fluorescence. La durée de vie de fluorescence est une des caractéristiques les plus importantes de la fluorescence. On se rappelle que l'émission de fluorescence est un phénomène aléatoire d'instant quand la molécule émet son photon. Ainsi la fonction de déclin $I(t)$, si elle est normalisée, représente la densité de probabilité de la durée pendant laquelle la molécule demeure en état excité avant émission d'un photon de fluorescence. La distribution de la durée de vie d'une molécule est alors une loi exponentielle. Un modèle plus général, et très répandu, du déclin de fluorescence est le modèle multiexponentiel donné par

$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i} . \quad (1.1)$$

Les paramètres a_i et τ_i peuvent avoir des significations physiques directes ou indirectes. Par exemple, dans un mélange de plusieurs fluorophores, les paramètres τ_i correspondent aux durées individuelles de vie de fluorescence. Ou encore, quand deux fluorophores ont la même intensité d'émission, c'est généralement le cas lorsqu'un même fluorophore se trouve dans deux milieux différents, les valeurs $\alpha_i \equiv a_i \tau_i$ représentent les proportions de molécules dans chaque milieu. Cependant, dans de nombreux cas, il est beaucoup moins évident de trouver une interprétation physique des paramètres a_i et τ_i . Mais ceci n'empêche pas que des sommes ou des différences de fonctions exponentielles de la forme (1.1) soient un modèle adéquat pour des déclins photophysiques (Ware *et al.*, 1973). Plusieurs autres modèles de déclins de fluorescence sont connus, en l'occurrence des distributions dites *stretched exponentials* ou des fonctions hyperboliques comprimées (Berberan-Santos *et al.*, 2005a,b).

La durée de vie de fluorescence désigne le temps moyen dont dispose le fluorophore pour interagir avec d'autres molécules ou diffuser dans son environnement. Typiquement, il est possible d'observer l'évolution temporelle de phénomènes qui se produisent dans l'intervalle de temps $[\tau/100, 10\tau]$, mais on ne peut obtenir aucune information précise sur des phénomènes qui ont lieu en dehors de ce laps de temps. En général, les durées de vie de fluorescence sont suffisamment longues par rapport à d'autres phénomènes comme la conversion interne de l'état S_1 à l'état fondamental, la réaction avec des molécules avoisinantes ou le transfert d'énergie à d'autres molécules. Les durées de vie de fluorescence sont généralement de l'ordre de 10^{-8} s. Ceci est long comparé aux relaxations vibrationnelles et à la conversion interne au plus bas niveau vibrationnel de l'état S_1 qui se produisent en moins de 10^{-12} s. Ainsi ces processus ne sont pas en concurrence avec la fluorescence, car ils la précèdent entièrement. En revanche, les durées de vie de phosphorescence sont beaucoup plus longues, typiquement de l'ordre d'une millièème de seconde; il n'est pas rare qu'elles atteignent quelques minutes voir quelques heures. La phosphorescence persistante des aiguilles de montre ou des autocollants qui brillent dans la nuit en est une illustration. Cette différence en longueur des durées de vie de phosphorescence et de fluorescence s'explique par le fait que des états triplets se dégradent plus lentement que des états singulets.

Des nombreux facteurs sont susceptibles d'affecter la durée de vie de fluorescence d'une

molécule et le rendement quantique. On peut distinguer plusieurs mécanismes d'inhibition de la fluorescence. Lors de l'*inhibition dynamique*, le fluorophore se désexcite pendant la collision avec une molécule de solvant, l'*inhibiteur*. On peut citer comme exemples d'inhibiteurs l'oxygène, des halogènes, des amines, et l'acrylamide. Une autre forme est l'*inhibition statique* où le fluorophore forme un complexe non fluorescent avec un inhibiteur lorsque le fluorophore se trouve en état fondamental. En outre, il y a des mécanismes banals qui inhibent la fluorescence comme l'atténuation de la lumière incidente par des fluorophores eux-mêmes ou par d'autres substances. Nous référons à Jiskoot *et al.* (2005) pour d'autres exemples d'inhibition.

Un autre processus affectant la fluorescence est le *transfert d'énergie entre molécules fluorescentes* (abrégé FRET, de l'anglais *Förster resonance energy transfer*). Une molécule donneur, initialement dans l'état énergiquement excité, peut transférer de l'énergie à une molécule accepteur qui se trouve en proximité, typiquement à moins de 10 nm. Ce transfert d'énergie résulte d'une interaction dipôle-dipôle et est invisible. En biochimie, le FRET est souvent utilisé pour étudier les interactions entre deux protéines.

Les paramètres physiques et chimiques qui caractérisent le microenvironnement d'une molécule et qui peuvent affecter sa fluorescence, sont entre autres, le pH, la pression, la viscosité, la température, le potentiel électrique, la présence d'ions et la polarité. En général, une hausse de température provoque une baisse du rendement quantique et une diminution de la durée de vie de fluorescence, car les processus non radiatifs qui sont liés à l'agitation thermique comme la collision avec des molécules de solvant, des vibrations et des rotations sont plus efficaces quand la température est élevée.

Il apparaît clair que le rendement quantique de fluorescence fournit des informations similaires sur la molécule et son environnement. Cependant il est très difficile de le déterminer. Par conséquent, l'outil de choix pour l'étude des processus moléculaires dynamiques sont les durées de vie de fluorescence, qui sont de nos jours utilisées dans de nombreuses applications dans des domaines divers.

Applications des durées de vie de fluorescence

La polyvalence des durées de vie de fluorescence a abouti à des applications nombreuses et très variées. Les exemples qui suivent sont choisis de manière aléatoire et cette liste ne prétend pas être exhaustive. L'objectif est de donner une idée de l'importance et de la polyvalence des durées de vie de fluorescence en chimie, en biologie et en médecine.

Mesure de distances moléculaires. Un problème fréquent en chimie des protéines et des polymères est l'identification des distances entre deux sites spécifiques d'une molécule. Une solution est basée sur la fluorescence : on attache un fluorophore à un site d'une molécule et un inhibiteur à l'autre, où l'inhibiteur est choisi de telle manière qu'il désactive le fluorophore dès que l'inhibiteur est assez proche du fluorophore. Ainsi la fluorescence diminue si les deux sites sont proches, autrement elle reste inchangée. La mesure de la durée de vie de fluorescence du fluorophore et la connaissance spectrale du fluorophore permet alors d'estimer la distance entre les deux sites. Une alternative pour mesurer cette distance est d'attacher à la protéine deux fluorophores différents qui interagissent de manière connue. Par exemple, on peut utiliser un fluorophore (l'*accepteur*) qui est excité par l'énergie reçue par transfert de l'énergie (FRET) provenant de l'autre fluorophore (le *donneur*). L'analyse des durées de vie des deux fluorophores permet alors de déduire la distance entre eux (Pin *et al.*, 2007).

Cette approche a été perfectionnée afin d'observer des *changements conformationnels* d'une molécule qui n'est pas rigide et subit d'importants changements conformationnels dynamiques comme par exemple certains polymères. Des fluorophores attachés sur la même molécule suivent la dynamique qui se traduit par des modifications de leurs caractéristiques de fluorescence. Or, l'évolution des durées de vie de fluorescence permet de calculer la distance moyenne entre les sites où les fluorophores sont situés. On peut même estimer l'ampleur des mouvements et la distribution de déformations autour de la forme en équilibre.

Imagerie microscopique de durées de vie de fluorescence. Le FLIM, de l'anglais *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, permet d'analyser l'hétérogénéité d'un tissu organique ou d'un autre matériau en fournissant des images microscopiques où chaque pixel représente la durée de vie de fluorescence locale dans le matériau. Les différentes durées de vie s'expliquent par l'effet du microenvironnement sur le fluorophore distribué dans le matériau hétérogène et éclairent sur la localisation de modifications chimiques ou physiques. Le FLIM est un moyen robuste d'acquisition d'informations spatiales sur le microenvironnement d'un fluorophore (Crissman & Steinkamp, 2000).

Rotations moléculaires. En chimie des protéines, des membranes et des polymères, il est important de connaître la vitesse de rotation de certaines parties de molécule. Afin d'observer ce mouvement, un fluorophore est attaché rigidement à la partie en question de sorte qu'il suive le mouvement de la molécule. Ensuite, le fluorophore est excité avec de la lumière polarisée, et les durées de vie associées à la lumière polarisée parallèlement et perpendiculairement par rapport à la lumière incidente sont observées. Ceci permet de déterminer la vitesse de rotation de la molécule dans des directions différentes (Serdyuk *et al.*, 2007).

Formation d'exciplexe. La formation d'exciplexe est un autre processus qui affecte la fluorescence et qui peut donc servir à analyser les dynamiques de polymères. Beaucoup de chromophores organiques n'interagissent pas entre eux lorsqu'ils se trouvent dans l'état fondamental. Cependant, ils deviennent réactifs lorsqu'ils sont portés dans un état énergétique excité où ils peuvent réagir avec un autre chromophore qui est dans l'état fondamental pour former un *exciplexe*. Les caractéristiques de fluorescence d'exciplexes sont généralement différentes de celles du simple chromophore. Alors grâce aux modifications des durées de vie de fluorescence dû à la formation d'exciplexes, on peut déduire les dynamiques de polymères.

En somme, les durées de vie de fluorescence dépendent du milieu de la molécule émettant et de tous les processus à l'état excité qui se produisent sur une échelle de temps comparable à celle des durées de vie de fluorescence. La grande sensibilité des caractéristiques de fluorescence et la facilité avec laquelle on peut attacher un fluorophore sur une molécule spécifique offrent un outil d'analyse très puissant qui est très répandu en biologie, en chimie, en médecine. Malgré tout, une condition nécessaire pour l'utilisation des durées de vie de fluorescence est l'aptitude à les mesurer.

1.1.2 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

La *spectroscopie de fluorescence*, ou la *fluorimétrie*, fait référence à toute technique mesurant des caractéristiques de fluorescence en utilisant une source lumineuse pour exciter l'échantillon. Des appareils qui mesurent la fluorescence sont appelés des *fluorimètres*, et on distingue deux types de méthode de mesure. La *spectrofluorimétrie stationnaire* se fonde sur une source lumineuse

constante pour mesurer l'intensité de la fluorescence et des longueurs d'onde d'émission (Royer, 1995). A l'opposé, la *fluorimétrie résolue en temps*, quant à elle, vise à déterminer les durées de vie de fluorescence en mesurant la dépendance temporelle de l'émission de fluorescence d'un échantillon par rapport à l'excitation lumineuse (Valeur, 2002). En général, des techniques résolues en temps fournissent beaucoup plus d'informations sur des processus intra- et intermoléculaires que la spectrofluorimétrie stationnaire. Il est, par exemple, possible que deux fluorophores aient le même spectre d'émission, alors que leurs durées de vie de fluorescence sont différentes. Puisque la fluorimétrie résolue en temps est généralement plus puissante, nous ne considérerons que ce type de technique dans la suite.

L'échelle de temps très courte de la fluorescence nécessite des dispositifs optiques et électroniques très performants afin de mesurer l'émission de fluorescence résolue en temps. En effet, c'est un défi technique de déterminer avec précision des temps aussi courts que quelques nanosecondes ($1\text{ ns} = 10^{-9}\text{ s}$), voire quelques picosecondes ($1\text{ ps} = 10^{-12}\text{ s}$). En fluorescence résolue en temps, il y a deux approches très répandues pour déterminer des durées de vie : la *fluorimétrie de phase*, fondée sur des mesures dans l'espace des fréquences, et la *fluorimétrie impulsionnelle* où les mesures sont dans l'espace des temps. Les deux techniques sont basées sur l'observation de la relation entre l'excitation et la réponse de fluorescence de l'échantillon afin d'en déduire les durées de vie de fluorescence. Outre ces deux méthodes, il existe d'autres techniques de mesure comme des cameras à balayage de fente, des méthodes basées sur le phénomène de l'*up-conversion*, ou des techniques stroboscopiques.

Un aperçu sur des diverses techniques de fluorimétrie et leurs principes généraux de fonctionnement est présenté dans Lakowicz (1991, 1999), Valeur (2002), Jiskoot *et al.* (2005) et Demas (1983). Beaucoup plus de détails sur la fluorescence résolue en temps sont fournis dans van de Ven *et al.* (2005). Le livre de O'Connor & Phillips (1984) est entièrement dédié à la technique TC-SPC qui sera exposée succinctement dans le paragraphe 1.1.2. Pour des informations récentes sur les avancées techniques des appareils, comme la résolution temporelle des mesures ou la fréquence de répétition de laser, nous renvoyons aux pages web des développeurs des fluorimètres (<http://www.becker-hickl.de>, <http://www.horiba.com> et <http://www.picoquant.com>).

Principes généraux de la fluorimétrie de phase

Le principe de la fluorimétrie de phase est basé sur une source lumineuse modulée sinusoïdalement qui éclaire l'échantillon. La réponse de fluorescence est donc également modulée sinusoïdalement à la même fréquence mais retardée et partiellement démodulée par rapport à l'excitation. Le retard est autant plus important que la durée de vie est longue. Techniquement il est possible de mesurer ce retard avec précision même pour de très hautes fréquences. Cette technique permet en conséquence de déterminer des durées de vie très courtes. En effet, historiquement les premières durées de vie de fluorescence ont été déterminées avec cette technique par Gaviola (1926).

A chaque fréquence angulaire de l'excitation $\omega = 2\pi f$, où f est la fréquence en Hz, le retard est décrit par le *déphasage* φ_ω , qui augmente de 0° à 90° quand la fréquence augmente. En plus, la réponse de l'émission est démodulée d'un facteur m_ω , qui diminue de 1 à 0 lorsque la fréquence augmente et que l'on appelle le *rapport de modulation*, voir Figure 1.3.

Lorsque le déclin de fluorescence est monoexponentiel, le déphasage φ_ω et le rapport de modulation m_ω sont liés à la durée de vie de fluorescence τ par

$$\tan \varphi_\omega = \omega\tau \quad \text{et} \quad m_\omega^2 = \frac{1}{1 + \omega^2\tau^2} .$$

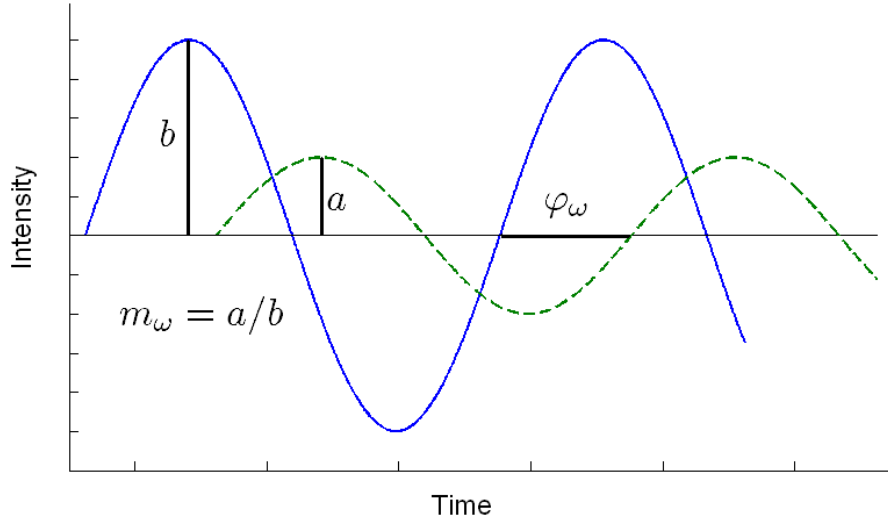


Figure 1.3: Déphasage et rapport de modulation de la réponse de fluorescence (ligne discontinue) par rapport à l'excitation (ligne solide).

Quand le déclin de fluorescence est multiexponentiel de la forme $I(t; \theta) = \sum_{k=1}^K \alpha_k e^{-t/\tau_k}$, avec des paramètres $\theta = (\tau_1, \dots, \tau_K, \alpha_1, \dots, \alpha_K)$, alors le déphasage $\varphi_\omega(\theta)$ et le rapport de modulation $m_\omega(\theta)$ associés à la fréquence angulaire ω sont donnés par

$$\tan \varphi_\omega(\theta) = \frac{N_\omega(\theta)}{D_\omega(\theta)} \quad \text{et} \quad m_\omega^2(\theta) = N_\omega^2(\theta) + D_\omega^2(\theta),$$

où

$$N_\omega(\theta) = \frac{\int_0^\infty I(t; \theta) \sin(\omega t) dt}{\int_0^\infty I(t; \theta) dt} = \frac{\sum_{k=1}^K \frac{\alpha_k \omega \tau_k^2}{(1 + \omega^2 \tau_k^2)}}{\sum_{k=1}^K \alpha_k \tau_k}$$

$$D_\omega(\theta) = \frac{\int_0^\infty I(t; \theta) \cos(\omega t) dt}{\int_0^\infty I(t; \theta) dt} = \frac{\sum_{k=1}^K \frac{\alpha_k \tau_k}{(1 + \omega^2 \tau_k^2)}}{\sum_{k=1}^K \alpha_k \tau_k}$$

Il est souhaitable de mesurer le déphasage et le rapport de modulation pour une large gamme de fréquences. Ces mesures forment la *réponse harmonique* de l'émission. Pour calculer les durées de vie de fluorescence τ_k à partir de la réponse harmonique obtenue expérimentalement, on utilise généralement la méthode des moindres carrés (Lakowicz *et al.*, 1984; Gratton *et al.*, 1984). Pour trouver le meilleur ajustement entre les données et le modèle multiexponentiel, on varie le paramètre θ afin de minimiser la statistique de 'goodness-of-fit' χ_R^2 définie par

$$\chi_R^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{\omega} \left(\frac{\varphi_\omega - \varphi_\omega(\theta)}{\sigma_{\varphi_\omega}} \right)^2 + \frac{1}{\nu} \sum_{\omega} \left(\frac{m_\omega - m_\omega(\theta)}{\sigma_{m_\omega}} \right)^2,$$

où ν est le degré de liberté, et σ_{φ_ω} et σ_{m_ω} représentent respectivement l'incertitude des mesures de déphasage et l'incertitude des mesures de rapport de modulation. Ces valeurs sont à estimer à partir des mesures. La justesse du modèle est jugée par la valeur de la statistique χ_R^2 . Pour un modèle approprié, on requiert que la statistique χ_R^2 soit proche de l'unité.

L'utilisation de la fluorimétrie de phase est très répandue, car les mesures y sont très rapides et il est possible de déterminer de très courtes durées de vie (inférieures à la nanoseconde). De plus, l'analyse des données est relativement simple dans le cas monoexponentiel. La différence principale avec la fluorimétrie impulsionnelle est que l'ajustement de modèle est effectué directement dans l'espace des fréquences. Ceci implique qu'aucune déconvolution d'un éventuel bruit de l'appareillage n'est requise contrairement à la fluorimétrie impulsionnelle. Parmi les inconvénients que présente la méthode, on peut citer cette contrainte selon laquelle les modulations ne sont pas bruitées et le fait que l'incertitude de l'estimation de paramètres augmente sensiblement pour des déclin multiexponentiels.

Time-Related Single Photon Counting

La technique *time-correlated single photon counting* (TCSPC) consiste en l'éclairage périodique de l'échantillon par une très brève impulsion lumineuse et la mesure de l'intervalle de temps entre l'impulsion et la détection de photons de fluorescence. Après un grand nombre d'impulsions, on obtient un histogramme de la distribution de probabilité des durées de vie de fluorescence.

Le cœur de la technique TCSPC est le convertisseur temps-amplitude, c'est-à-dire le TAC, de l'anglais *time-to-amplitude converter*, qui joue le rôle de chronomètre et permet de mesurer des durées plus courtes que la picoseconde avec beaucoup de précision. La première utilisation historique du TAC dans une approche de mesurer des durées de vie de fluorescence fût en 1961 par Koechlin (1961), c'est-à-dire bien après la découverte de la fluorimétrie en phase en 1926. Dans les années 70, la technique TCSPC est devenue très rapidement une méthode standard, et même de nos jours des efforts ne cessent d'être fournis pour l'améliorer et la raffiner.

La Figure 1.4 décrit le schéma de principe de la technique TCSPC standard. D'après ce diagramme, l'expérience est effectuée comme suit : Au début d'un cycle d'excitation la source lumineuse émet une impulsion très brève et le faisceau est divisé en deux. La partie principale du faisceau traverse quelques dispositifs optiques comme des filtres et des monochromateurs, afin de sélectionner une unique longueur d'onde d'excitation qui est appropriée pour exciter l'échantillon. L'autre partie du faisceau est envoyé directement au TAC. Ce signal de la lampe est interprété par le TAC comme le signal de départ et définit ainsi le temps 0. Quand le signal de départ est reçu, le TAC démarre le chargement d'un condensateur. Quand les molécules excitées émettent des photons de fluorescence, la lumière traverse d'abord des filtres optiques afin de séparer les photons de fluorescence de la lumière incidente et de sélectionner une longueur d'onde spécifique. Ainsi, dans le cas idéal, seuls des photons provenant de la fluorescence arrivent sur le détecteur. Comme l'énergie d'un photon est très faible, il est nécessaire de l'amplifier en un signal électrique mesurable au moyen d'un photomultiplicateur. Le signal mesurable est ensuite transmis au TAC, ici le chronomètre. Le signal arrivant est interprété comme le signal d'arrêt qui provoque la décharge du condensateur. Le voltage émis par le TAC est proportionnel à la durée entre les signaux de départ et d'arrêt. Après la digitalisation du voltage, l'analyseur multicanaux incrémente d'une unité le contenu de la mémoire du canal correspondant à la valeur digitale de la durée mesurée. L'expérience est répétée de très nombreuses fois afin de construire un histogramme qui permet de déduire les durées de vie de fluorescence par une méthode d'analyse appropriée, voir Section 1.3.

Pour une modélisation exacte et réaliste des données, une connaissance suffisante de l'influence de chaque composante de l'appareil sur les mesures est indispensable. Pour cela nous donnons maintenant quelques détails techniques sur certaines composantes individuelles de l'appareil de

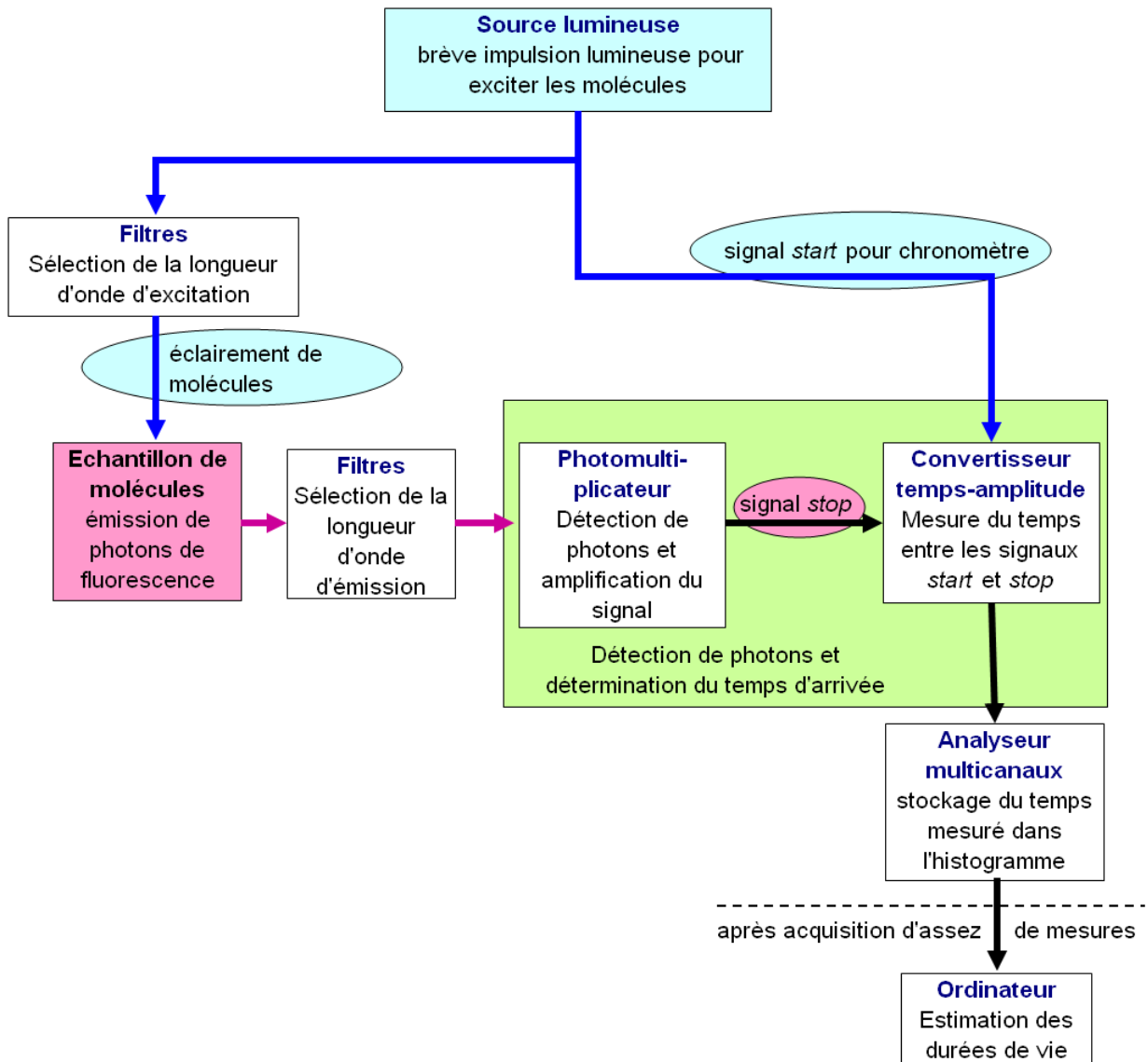


Figure 1.4: Schéma de la technique TCSPC standard.

mesure TCSPC. La *source lumineuse* est pour la plupart du temps un laser pulsé, mais des lampes flash sont également utilisées. La fréquence de répétition des lampes flash est relativement basse ($10^4 - 10^5$ Hz) comparé à celles des lasers qui dépassent facilement les 50 MHz. Toutefois, pour des mesures de fluorescence, la fréquence doit être réglée autour de 1 à 4 MHz, afin d'assurer que des photons avec des temps d'arrivée élevés soient également observés. En ajustant l'intensité du laser, le nombre moyen par cycle de photons de fluorescence qui atteignent le détecteur est sélectionné. Plus l'intensité de laser est élevée, plus il y a des photons de fluorescence. Comme la durée de vie de fluorescence est un phénomène extrêmement rapide, il est important que l'impulsion lumineuse d'excitation soit aussi instantanée que possible, c'est-à-dire que la largeur de l'impulsion doit être aussi courte que possible. La largeur des impulsions s'étend de 0,1 ps à quelques picosecondes. Néanmoins, dans la plupart des cas, il est nécessaire de prendre en compte le profil d'intensité de la lampe dans le modèle de données. Plus précisément, le temps d'arrivée est le résultat de la convolution de la durée de vie de fluorescence avec le profil de l'impulsion lumineuse. A part la largeur d'impulsion, un autre problème fréquent affectant les mesures de TCSPC est l'instabilité de l'intensité de la lampe. Il est ainsi possible que la forme de l'impulsion évolue durant l'expérience.

Le *photomultiplicateur* qui détecte des photons individuellement est constitué d'un tube électronique. L'arrivée d'un photon sur la photocathode provoque l'expulsion de quelques électrons de faible énergie. Ils sont ensuite attirés par l'anode au côté opposé à la fin du tube. Un champ électrique accélère les électrons, et plusieurs dynodes multiplient leur nombre. Finalement, quand les électrons arrivent sur l'anode, l'accumulation de leurs charges se transforme en une brève impulsion de courant, signalant l'arrivée d'un photon sur la cathode. Le temps de transit des photoélectrons dans le tube est aléatoire, et il peut être utile de le prendre en compte dans l'analyse des données. Mais grâce au progrès technique, des photomultiplicateurs très rapides sont aujourd'hui disponibles. Un inconvénient des photomultiplicateurs sont les éventuels *dark counts*, c'est-à-dire des arrivées d'électrons sur l'anode, bien qu'il n'y ait pas eu d'arrivée de photon sur la cathode.

Avec un *convertisseur temps-amplitude* (TAC) de très haute performance il est possible de déterminer des temps aussi courts que 0,8 ps. Cependant, un grand défaut du TAC est le fait qu'il ne peut mesurer qu'un seul temps d'arrivée par cycle. Car une fois le condensateur déchargé, il est impossible de déterminer un autre temps. Par conséquent, pendant un cycle d'excitation, seul le temps d'arrivée du premier photon qui arrive sur le détecteur est enregistré. Tout autre photon arrivant après est perdu. Cette perte de photons crée une distorsion de la distribution des temps d'arrivée, que l'on appelle l'*effet d'empilement*. L'importance de l'empilement dépend du nombre de photons reçus par cycle. La perte de photons est autant plus importante et la distribution plus distordue, que le nombre de photons reçus est élevé. Dans la littérature, l'impact sévère de l'empilement est bien connu, et la plupart d'auteurs soulignent l'importance de l'éviter. Ceci étant, les expériences actuelles sont généralement effectuées avec une intensité de laser très basse, tel que le nombre de photons par cycle soit très faible. Beaucoup d'auteurs recommandent de maintenir le nombre de photons par cycle au-dessous de 5%, voire même 2%, car, dans ce cas, l'empilement est négligeable et n'est pas à prendre en considération dans l'analyse des données. Cependant, l'intensité très basse entraîne que la plupart du temps (dans plus de 97% de cycles) aucun photon n'est détecté. En conséquence, le temps nécessaire pour enregistrer suffisamment de temps d'arrivée de photons pour une estimation fiable des paramètres, devient très long. Des longs temps d'acquisitions sont toujours gênants, surtout lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être analysé, comme c'est le cas dans l'imagerie microscopique de durées de vie de fluorescence (FLIM), où la durée de vie de chaque pixel est à déterminer. Pire encore, plus le temps d'acquisition est long, plus des instabilités de l'instrument ou de l'échantillon sont susceptibles

d'apparaître. Par exemple, l'intensité de laser n'est pas constante, ou des réactions chimiques changent les caractéristiques de fluorescence pendant la durée de l'expérience. Une solution courante serait l'utilisation de plusieurs TAC permettant de mesurer plusieurs photons par excitation. Ici encore, le problème demeure que le nombre de temps d'arrivée observé est déterminé par le nombre de TAC utilisés, et donc il y a ainsi toujours cette possibilité de ne pas observer tous les photons de fluorescence durant un cycle. On remarque qu'il est en général impossible de déterminer le nombre total de photons de fluorescence arrivant sur le détecteur durant un cycle d'excitation.

Intuitivement, ce procédé de maintenir l'intensité très basse ne semble pas très efficace, car la détection d'un photon devient un événement rare. L'objectif de cette thèse est de construire un estimateur adapté à l'effet d'empilement. Celui-ci permettra entre autre d'augmenter l'intensité du laser, et donc d'accroître le nombre d'excitations qui provoque la détection d'un photon. Cela nous paraît être un moyen de raccourcir ainsi le temps d'acquisition.

L'*analyseur multicanaux* est constitué d'un nombre fixé de canaux de largeur variable. La largeur du canal détermine la résolution temporelle des mesures. De plus, la longueur de l'intervalle d'observation dépend du nombre de canaux et de la largeur du canal sélectionnée. Tout photon arrivant après cet intervalle est perdu. Cette perte de photons est appelée le *cut-off*. Pendant bien longtemps, un analyseur multicanaux standard possédait environ 500 canaux, mais aujourd'hui leur nombre peut atteindre les 65.000 canaux avec une résolution d'une picoseconde.

Un pré-requis pour une estimation réussie des durées de vie de fluorescence est un modèle de données approprié. A cause de l'échelle de temps très courte des durées de vie, il est en général nécessaire de prendre en compte le bruit instrumental. La *fonction d'appareil* résume toute sorte de bruit en provenance de divers dispositifs électroniques, essentiellement le profil de l'impulsion lumineuse d'excitation et le temps de transit dans le photomultiplicateur comme mentionné préalablement. La fonction d'appareil est individuelle pour tout instrument et elle n'appartient pas à un modèle paramétrique classique. Pourtant, elle est facile à enregistrer en effectuant des mesures où l'échantillon fluorescent est remplacé par une solution diffusante. La distribution des mesures TCSPC est donc la convolution de la fonction de déclin de fluorescence avec la fonction d'appareil.

La technique TCSPC offre de nombreux avantages. Il faut tout d'abord mentionner la haute sensibilité et la haute résolution temporelle des mesures. Les mesures sont donc très précises et on obtient de bonnes valeurs estimées pour les durées de vie de fluorescence. De plus, à l'opposé de la fluorimétrie de phase, l'analyse de déclin multiexponentiels est facile. Cependant, on compte parmi les inconvénients de la technique, la nécessité de faire une déconvolution de la fonction d'appareil ainsi que de longs temps d'acquisition dû à l'effet d'empilement.

L'objet central de cette thèse sera l'étude des données ayant la structure de mesures TCSPC soumis à l'effet d'empilement. Le modèle statistique associé est défini dans le paragraphe suivant.

1.2 DÉFINITION DU MODÈLE D'EMPILEMENT

Nous donnons la définition mathématique du modèle d'empilement qui sera le sujet d'étude principal de cette thèse. En vue de l'application aux mesures TCSPC, nous détaillons les cas de distributions particulièrement intéressantes dans le contexte de la fluorescence. Ces dernières seront étudiées plus en détail dans les chapitres à venir. Nous précisons aussi les notations utilisées tout au long de cette thèse.

Soit $\{Y_k, k \geq 1\}$ une suite de variables aléatoires indépendantes et positives de *fonction de répartition initiale* F . Soit N une variable aléatoire indépendante de la suite $\{Y_k, k \geq 1\}$, à valeurs dans \mathbb{N} . On définit l'*observation empilée* Z comme étant la variable aléatoire à valeur dans $\overline{\mathbb{R}_+} = \mathbb{R}_+ \cup \{\infty\}$ donnée par

$$Z = \begin{cases} \min\{Y_1, \dots, Y_N\} & \text{si } N > 0 \\ \infty & \text{si } N = 0. \end{cases} \quad (1.2)$$

Nous montrerons (voir Chapitre 2, Lemme 2.1) que la fonction de répartition G de Z , appelée dans la suite *fonction de répartition empilée*, est donnée par

$$G(z) = 1 - M(1 - F(z)), \quad z \in \mathbb{R}_+,$$

où M désigne la fonction génératrice associée à N définie par

$$M(u) = \mathbb{E}[u^N], \quad u \in [0, 1]. \quad (1.3)$$

Par ailleurs, si F admet une densité f par rapport à la mesure de Lebesgue \mathcal{L}_+ sur \mathbb{R}_+ , alors G admet une densité g par rapport à la mesure $\overline{\mathcal{L}_+}$, qui est une masse ponctuelle à ∞ et dont la restriction sur \mathbb{R}_+ est \mathcal{L}_+ . En posant

$$\dot{M}(u) = \mathbb{E}[Nu^{N-1}], \quad u \in [0, 1], \quad (1.4)$$

la *densité empilée* g est alors

$$g(z) = \begin{cases} f(z)\dot{M}(1 - F(z)) & \text{si } z \in \mathbb{R}_+ \\ M(0) & \text{si } z = \infty. \end{cases} \quad (1.5)$$

Nous supposons que la distribution initiale F appartient à une famille de distributions dominées par \mathcal{L}_+ , qui est donc entièrement décrite par un ensemble de densités $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$. Le cas *paramétrique*, où l'ensemble de paramètres Θ est un sous-ensemble de \mathbb{R}^d , est étudié dans les Chapitres 2 et 3. En revanche, le Chapitre 4 est consacré au cas *non paramétrique*, où, plus précisément, f_θ est un mélange infini de distributions.

Quant à la distribution de N , on suppose qu'elle appartient à une famille paramétrique $\{p_\lambda, \lambda \in \Lambda\}$ avec $\Lambda \subset \mathbb{R}$. Pour un λ donné, on note

$$p_\lambda(k) = \mathbb{P}(N = k), \quad k \in \mathbb{N}.$$

Definition 1.1. On désigne par $\{g_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$, l'ensemble de densités obtenues par la relation (1.5), dominé par $\overline{\mathcal{L}_+}$. Ce modèle est appelé le *modèle d'empilement* associé à $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ et $\{p_\lambda, \lambda \in \Lambda\}$. Si la distribution p_{λ_0} de N est connue, le modèle d'empilement est donné par la famille $\{g_{\lambda_0,\theta}, \theta \in \Theta\}$.

Cette définition, en permettant une sélection libre de la distribution initiale et de la distribution de N , est encore plus générale qu'il ne faut pour les mesures TCSPC de fluorescence. Les remarques suivantes concernent les cas spécifiques auxquels on s'intéresse particulièrement dans le contexte de la fluorescence et que nous étudions en détail dans la thèse.

Distribution de Poisson de N

Dans le contexte du TCSPC, le nombre N de photons par cycle d'excitation suit une loi de Poisson,

$$p_\lambda(n) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}, \quad n \in \mathbb{N}.$$

Le paramètre λ étant le nombre moyen de photons par cycle, dépend directement de l'intensité de la lumière excitante. On identifiera alors le paramètre poissonien λ avec l'*intensité*. Puisque $\mathbb{P}(N = 0) = e^{-\lambda}$, un estimateur naturel de λ est donné par

$$\hat{\lambda} = \log \frac{n}{\sum_{i=1}^n \mathbb{1}\{Z_i = \infty\}},$$

où Z_1, \dots, Z_n désignent n observations empilées i.i.d. La fonction génératrice M de la loi de Poisson et sa dérivée \dot{M} définies en (1.3) et (1.4) sont alors

$$M(u) = e^{\lambda(u-1)} \quad \text{et} \quad \dot{M}(u) = \lambda e^{\lambda(u-1)}, \quad u \in [0, 1]. \quad (1.6)$$

Il en découle que dans le cas poissonien la fonction de répartition empilée s'écrit

$$G_{\lambda, \theta}(z) = 1 - \exp\{-\lambda F_\theta(z)\}, \quad z \in \mathbb{R}_+, \quad (1.7)$$

et la densité empilée est donnée par

$$g_{\lambda, \theta}(z) = \begin{cases} \lambda f_\theta(z) e^{-\lambda F_\theta(z)} & \text{si } z \in \mathbb{R}_+ \\ e^{-\lambda} & \text{si } z = \infty. \end{cases} \quad (1.8)$$

Il est important de remarquer que les observations où aucun photon de fluorescence n'est détecté (i.e. $N = 0$ et donc $Z = \infty$), n'apportent aucune information sur le paramètre θ de la loi initiale. En conséquence, dans le contexte de l'estimation de θ , on peut écarter de l'échantillon les observations empilées égales à ∞ . Ceci est équivalent à travailler avec un modèle d'empilement où N ne prend des valeurs que dans \mathbb{N}^* . Dans le Chapitre 3, on considère alors la *loi de Poisson restreinte à \mathbb{N}^** donnée par

$$p_\lambda(n) = \frac{\lambda^n}{(e^\lambda - 1)n!}, \quad n \in \mathbb{N}^*. \quad (1.9)$$

Dans ce cas la densité empilée s'écrit sous la forme

$$g_{\lambda, \theta}(z) = \frac{\lambda f_\theta(z) e^{-\lambda F_\theta(z)}}{1 - e^{-\lambda}}, \quad z \in \mathbb{R}_+.$$

Bien que la distribution restreinte soit utilisée dans des procédures d'estimation, il est indispensable de considérer la distribution sur tout \mathbb{N} dans l'analyse de la variance de l'estimateur, afin de prendre en compte le temps d'acquisition nécessaire pour collectionner les observations.

Distribution mono- et multiexponentielle pour la loi initiale

On a vu au Paragraphe 1.1.1 que la durée de vie de fluorescence suit généralement une loi exponentielle, et que le déclin de fluorescence d'un mélange de molécules est dans la majorité des cas un mélange de lois exponentielles, même lorsque les paramètres associés n'ont pas d'interprétation physique (Ware *et al.*, 1973). Nous définissons la *densité initiale multiexponentielle* par

$$f_{\theta}(y) = \sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k y}, \quad y > 0, \quad (1.10)$$

où $\theta = (\nu_1, \dots, \nu_K, \alpha_1, \dots, \alpha_K)^T$ est le vecteur de paramètres constitué des paramètres exponentiels positifs $\nu_k > 0$ et des poids de mélange $(\alpha_1, \dots, \alpha_K)^T$ vérifiant $\sum_{k=1}^K \alpha_k = 1$ et $\alpha_k > 0$. Les durées de vie de fluorescence τ_k correspondant à la durée moyenne de l'état excité sont donc données par $1/\nu_k$. La densité est dite *monoexponentielle* lorsque $K = 1$. Dans le contexte paramétrique considéré dans les Chapitres 2 et 3, l'*ordre de mélange* K est supposé fixé et connu.

Une définition plus générale d'un mélange exponentiel est obtenue par la représentation suivante,

$$f_{\mu}(y) = \int_0^{\infty} \nu e^{-\nu y} d\mu(\nu),$$

où μ désigne une mesure de probabilité sur \mathbb{R}_+ . Lorsque le support de μ est un ensemble fini, f_{μ} est évidemment un mélange exponentiel fini de la forme (1.10). Cependant, si μ n'est pas à support fini, f_{μ} représente alors un mélange d'un nombre infini de lois exponentielles, dit *mélange exponentiel infini*. Dans le Chapitre 4, la mesure mélangeante μ est supposée admettre une densité par rapport à la mesure de Lebesgue. Il est alors question d'estimer cette densité dans un cadre non paramétrique.

Bruit additif

En TCSPC, la loi initiale n'est en général pas un mélange exponentiel pur, mais plutôt une distribution multiexponentielle perturbée par un bruit additif provenant de l'appareil de mesure, voir Paragraphe 1.1.2. Ce bruit additif est aléatoire et connu sous le nom de *fonction d'appareil*. Sa densité de probabilité, désignée par η , n'appartient à aucun modèle paramétrique. Cependant, un histogramme de η est facile à enregistrer pour tout instrument de mesure. Par conséquent, on suppose dans la suite que la fonction d'appareil η est connue. Notons enfin que dans un modèle réaliste de mesures TCSPC, la loi initiale est la convolution d'un mélange exponentiel avec la fonction d'appareil, plus précisément,

$$f_{\theta} = \eta * \sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k \cdot}. \quad (1.11)$$

Censure à droite

En pratique, on ne peut pas attendre indéfiniment pour obtenir une réponse. Il est parfois utile d'inclure dans le modèle une durée maximale d'observation $T < \infty$. C'est ainsi que, dès que

$N = 0$ ou $Y_k \geq T$ pour tout $k = 1, \dots, N$, on convient de dire qu'on observe T . Plus précisément, la variable aléatoire empilée Z est donc définie, contrairement à (1.2), par

$$Z = \min\{Y_1, \dots, Y_N, T\}. \quad (1.12)$$

Dans une expérience, T est typiquement choisi relativement large afin d'éviter la censure d'événements se produisant après T . Dans la littérature rattachée à la fluorescence, la censure à droite est appelée le *cut-off*.

1.3 QUELQUES MÉTHODES D'ANALYSE DES MESURES TCSPC

Dans ce paragraphe nous faisons une synthèse des méthodes existantes d'analyse des mesures TCSPC. Le mode opératoire de l'appareil de mesure conduit à en identifier deux classes : celles associées aux mesures pour lesquelles l'effet d'empilement est négligeable et celles qui au contraire traitent des mesures où l'effet d'empilement est bien présent.

Dans le contexte du TCSPC, l'importance de l'effet d'empilement dépend de la distribution du nombre N de photons par cycle d'excitation. Comme N suit une loi de Poisson de paramètre λ , la probabilité de l'arrivée de deux photons ou plus par cycle est négligeable lorsque l'intensité λ est suffisamment petite. Par exemple pour $\lambda = 0.05$ cette probabilité vaut 0.0012. Dans ce cas, l'effet d'empilement est négligeable, car seuls deux événements sont probables : soit aucun photon n'est détecté, soit exactement un photon atteint le détecteur. Par conséquent, si l'intensité λ est très basse, on peut considérer les photons enregistrés comme des réalisations i.i.d. de la distribution initiale sans empilement, et des estimateurs standards pour le modèle initial peuvent être utilisés.

Dans la communauté des utilisateurs du TCSPC, l'effet d'empilement est généralement considéré comme source d'erreur supplémentaire augmentant les difficultés de l'estimation des paramètres. Bon nombre d'auteurs conseillent d'éviter l'empilement par tous les moyens ; il est ainsi largement reconnu qu'on opère le TCSPC dans le mode où l'effet d'empilement est négligeable. D'ailleurs, la littérature sur le TCSPC recommande d'utiliser $\lambda \leq 0.05$, voire $\lambda \leq 0.02$ ou $\lambda \leq 0.01$, voir par exemple Valeur (2002). Dans ce contexte la méthode la plus utilisée pour estimer les durées de vie de fluorescence est la méthode des moindres carrés. En ce qui concerne les méthodes adaptées à l'effet d'empilement, qui sont peu nombreuses, la plus importante est la « correction » d'histogramme (Coates, 1968).

1.3.1 ANALYSE EN ABSENCE D'EFFET D'EMPILEMENT

Lors des premières années qui ont suivi l'apparition de la technique de mesure TCSPC, un grand nombre de méthodes statistiques classiques ont été appliquées aux mesures TCSPC obtenues avec une intensité très basse, c'est-à-dire pour lesquelles l'effet d'empilement est négligeable. Sans être exhaustif, on peut citer la méthode des moments (Isenberg & Dyson, 1969), l'utilisation des transformées de Laplace (Gafni *et al.*, 1975) ou des transformées de Fourier (Hunt, 1971), une méthode basée sur des *modulation functions* (Valeur, 1978), la méthode des moindres carrés pondérés (Grinvald & Steinberg, 1974) ou encore la méthode des moindres carrés pour ajuster un mélange exponentiel fini avec un très grand nombre de composantes exponentielles (Ware *et al.*, 1973). La

performance de ces méthodes est examinée dans le contexte de l'application aux mesures TCSPC dans les travaux de McKinnon *et al.* (1977) et O'Connor *et al.* (1979). Ces auteurs font le même constat : la méthode des moindres carrés pondérés semble la mieux adaptée aux mesures TCSPC. Ce qui justifie le fait que cette méthode se soit rapidement imposée dans la pratique au point que de nos jours elle reste la plus utilisée dans l'analyse des mesures TCSPC.

En dépit de la popularité de cette méthode des moindres carrés, plusieurs autres méthodes ont vu le jour un peu plus tard. Tout d'abord, Hall & Selinger (1981) proposent un estimateur de maximum de vraisemblance. Ce dernier présente l'avantage d'être performant sur des petits échantillons. Contrairement à la méthode des moindres carrés, qui nécessite un plus grand nombre d'observations, l'application de l'estimateur de maximum de vraisemblance peut permettre de réduire le temps d'acquisition. Une méthode alternative proposée par Livesey & Brochon (1987) et Brochon (1994) est la méthode du maximum d'entropie. Elle fournit un estimateur de la densité mélangeante d'un mélange exponentiel infini. Bien que ces deux approches soient très intéressantes, elles n'ont pas reçu beaucoup d'attention et aucune d'elles n'a pu supplanter la méthode des moindres carrés pondérés qui demeure la méthode la plus répandue pour analyser des mesures TCSPC.

La méthode des moindres carrés est une approche relativement simple et générale. Elle consiste à approcher l'histogramme des données par une fonction paramétrée en ajustant les paramètres de sorte que la statistique χ^2 soit minimale. La statistique χ^2 associée aux mesures Z_1, \dots, Z_n est la somme quadratique des déviations des mesures définie par

$$\chi^2(\theta) = \sum_j \frac{(n_j - f_\theta(t_j))^2}{n_j^2},$$

où n_j désigne le nombre d'observations Z_i dans la j^{e} classe de l'histogramme, f_θ la densité initiale de paramètre θ et t_j un point appartenant à la j^{e} classe de l'histogramme. Dans la plupart des cas, f_θ est la convolution d'une densité mono- ou multiexponentielle avec la fonction d'appareil. La minimisation est généralement effectuée avec la méthode de Marquardt (1963). Par ailleurs, il est possible de faire l'ajustement uniquement sur une partie de l'histogramme, ce qui permet d'écarter des zones où l'incertitude est plus élevée ou celles où le modèle théorique n'est pas approprié.

En revanche, l'inconvénient principal de la méthode des moindres carrés est cette nécessité de recourir à un très grand nombre d'observations afin de fournir des résultats d'estimation satisfaisants. Bien que la méthode des moindres carrés soit optimale dans un sens asymptotique, c'est-à-dire pour des échantillons de très grande taille, elle donne des estimations biaisées lorsqu'elle est appliquée aux petits échantillons et sa variance est beaucoup trop grande (Ryan, 2008). Pour travailler avec des petits échantillons, les méthodes comme l'estimateur du maximum de vraisemblance sont plus adéquates et plus performantes.

Comment expliquer alors cet attachement à la méthode des moindres carrés ?

L'engouement pour la méthode des moindres carrés reflète la perception du problème d'estimation par des utilisateurs du TCSPC ayant adopté le point de vue de la théorie de *errors-in-variables*. Pour eux, la fonction de déclin correspond à une quantité physique que l'on ne peut pas observer directement, mais dont seulement une version perturbée par des erreurs est observée. Ceci n'est cependant pas la raison pour laquelle les données ne correspondent pas exactement au modèle ! En effet, le manque de déterminisme est principalement dû à la nature aléatoire du phénomène physique et non pas aux erreurs de mesure (Carroll & Ruppert, 1988).

D'ailleurs, l'objectif principal en TCSPC est l'estimation des paramètres de la loi initiale, et

non l'estimation de la fonction de déclin elle-même. Cependant, dans la littérature en fluorescence, un point de vue très répandu est que l'objet d'intérêt est la fonction de déclin, comme illustré par la citation suivante.

"The single photon counting measurement relies on the concept that the probability distribution for emission of a single photon after an excitation event yields the actual intensity against time distribution of all the photons emitted as a result of the excitation. By sampling the single photon emission following a large number of excitation flashes, the experiment constructs this probability distribution." (O'Connor & Phillips, 1984, p.36)

Il est clair que l'ajustement du modèle est juste un moyen parmi d'autres pour obtenir des valeurs approchées des paramètres. Le point de vue selon lequel l'objet à mesurer est la fonction de déclin est restrictif et exclut des possibilités intéressantes pour estimer les durées de vie de fluorescence. Des alternatives pour extraire des informations sur les paramètres inconnus à partir de petits échantillons sont par exemple l'approche du maximum de vraisemblance ou la méthode des moments.

Toutes les méthodes mentionnées dans ce paragraphe partagent le même inconvénient : le prix à payer pour des mesures où l'effet d'empilement est négligeable est un très long temps d'acquisition. Prenant comme exemple le cas où l'intensité est de $\lambda = 0.05$. Alors la probabilité qu'il n'y ait aucun photon pendant un cycle d'excitation est de 0.9512. Par conséquent, la plupart du temps aucun photon n'est observé et donc aucune information sur les paramètres inconnus n'est obtenue. Pour remédier à cette « perte de temps », quelques approches ont été développées qui sont adaptées à l'effet d'empilement. Ces méthodes permettent alors d'acquérir les mesures à une intensité λ au-delà de 0.05.

1.3.2 ANALYSE EN PRÉSENCE DE L'EFFET D'EMPILEMENT

L'effet d'empilement est non négligeable lorsque l'intensité est élevée. Pour des mesures obtenues dans ce cas il faut appliquer des méthodes d'analyse adaptées à l'effet d'empilement.

La première méthode corrigeant l'effet d'empilement est proposée par Coates (1968). Cette méthode transforme l'histogramme d'observations empilées dans un « histogramme » de la distribution initiale. En effet, l'histogramme corrigé est supposé approcher la densité initiale non distordue. La méthode de Coates ne fait aucune hypothèse sur la densité initiale, cependant N doit suivre une loi de Poisson ce qui est le cas en TCSPC. Walker (2002) a adapté la correction de Coates aux observations où l'intensité de laser est instable et varie d'une façon connue pendant le temps d'acquisition. Il propose un algorithme itératif. Souloumiac (2007) a généralisé la méthode de Coates à une distribution quelconque de N et proposé une formule de correction pour d'autres fonctionnelles que l'histogramme.

Okano *et al.* (2005) et Patting *et al.* (2007) appliquent la méthode des moindres carrés directement sur des observations empilées. Il s'agit alors d'ajuster la densité empilée à l'histogramme de mesures empilées. Cependant, dans les deux articles nous constatons des difficultés à calculer l'expression exacte de la densité empilée que nous fournissons dans (1.5). D'ailleurs, si l'objectif consiste à raccourcir le temps d'acquisition, la méthode des moindres carrés n'est pas convenable car elle requiert des grands échantillons. C'est pour cette raison que nous comparerons la performance des nouveaux estimateurs proposés dans les Chapitres 2 et 3 uniquement avec celle de la méthode de Coates et non avec la méthode des moindres carrés.

1.4 INÉGALITÉS D'INFORMATION SUR LES PARAMÈTRES DU MODÈLE

Dans le modèle d'empilement défini par (1.2) l'ampleur de l'effet d'empilement dépend de la distribution p_λ du nombre N de variables aléatoires sur lesquelles le minimum est évalué. La distorsion d'empilement est d'autant plus importante que la probabilité que N soit grand est élevée. Dans le contexte des mesures de fluorescence, la distribution p_λ est sélectionnée par l'utilisateur en ajustant l'intensité du laser. Cela soulève la question du meilleur choix de l'intensité λ . Dans ce but, nous étudierons dans le Chapitre 2 l'influence de la loi p_λ sur l'information sur les paramètres inconnus du modèle d'empilement.

En général, l'*information de Fisher* est une mesure de la quantité d'information qu'apporte une variable aléatoire X observable de loi P_{θ_0} sur le paramètre inconnu θ_0 . L'inverse de l'information de Fisher est connue sous le nom de *borne d'information de Cramér-Rao* représentant une borne inférieure de la variance d'un estimateur $T(X)$ sans biais de θ_0 . Des estimateurs atteignant la borne d'information sont appelés *efficaces* (voir par exemple Shao, 2003).

Dans la théorie de maximum de vraisemblance, des inégalités d'informations sont bien connues pour des *modèles réguliers*. Des conditions traditionnelles de régularité sur un modèle paramétrique $\mathcal{P} = \{P_\theta, \theta \in \Theta\}$ incluent l'existence de la deuxième dérivée de la densité, ainsi que la différentiation sous le symbole d'intégrale (voir par exemple Bickel & Doksum, 2001). Cependant, même dans des modèles simples comme la densité double exponentielle, $\frac{1}{2} \exp(-|x - \theta|)$, ces conditions ne sont pas vérifiées.

En atténuant la différentiabilité ponctuelle au profit de la différentiabilité en norme, on obtient une approche plus élégante avec moins de conditions sur le modèle. Le concept approprié est la *différentiabilité dans le sens de Hellinger* qui est la différentiabilité en norme L^2 de la racine carrée de la densité (voir Définition 1.2). La raison pour laquelle la condition de la différentiabilité seconde ponctuelle peut être remplacée par une simple dérivée en norme est le fait que la racine carrée d'une densité est un vecteur unitaire dans l'espace des fonctions de carré intégrable. L'inégalité d'information du Théorème 1.4, dont la démonstration est donnée dans Appendice A, est fondée sur cette propriété.

Soit $\mathcal{P} = \{P_\theta, \theta \in \Theta\}$ une famille de mesures de probabilité dominées par une mesure ν . L'ensemble des paramètres Θ est un ouvert de \mathbb{R}^d . La densité de P_θ par rapport à ν est notée f_θ et sa racine carrée $\xi_\theta \equiv \sqrt{f_\theta}$. On désigne par $\|\cdot\|$ la norme sur l'espace $L^2(\nu)$ et par $\langle \cdot, \cdot \rangle$ le produit scalaire associé. Conformément aux notations classiques d'analyse fonctionnelle on écrit νh pour indiquer l'intégrale $\int h d\nu$.

Définition 1.2. La famille de mesures de probabilité $\mathcal{P} = \{P_\theta, \theta \in \Theta\}$ dominée par la mesure ν est *différentiable au sens de Hellinger* en $\theta_0 \in \Theta$ avec dérivée $\dot{\xi}_{\theta_0}$ si $\dot{\xi}_{\theta_0}$ est un vecteur de longueur d de fonctions de $L^2(\nu)$ satisfaisant

$$\left\| \xi_\theta(x) - \xi_{\theta_0}(x) - (\theta - \theta_0)^T \dot{\xi}_{\theta_0}(x) \right\|_2 = o(|\theta - \theta_0|), \quad \text{quand } \theta \rightarrow \theta_0 .$$

Dans la théorie statistique classique, la matrice de l'information de Fisher est définie comme la variance de la dérivée $\dot{\ell}_\theta$ de la log-vraisemblance $\ell_\theta(x) = \log f_\theta(x)$ par rapport à θ . Sous des conditions de différentiabilité de Hellinger, la dérivée $\dot{\xi}_\theta$ prend le rôle de $\dot{\ell}_\theta$.

Définition 1.3. Si \mathcal{P} est différentiable au sens de Hellinger en θ_0 de dérivée $\dot{\xi}_{\theta_0}$, alors la *matrice*

d'information de Fisher est définie par

$$I_{\theta_0} \equiv 4 \int \dot{\xi}_{\theta_0} \dot{\xi}_{\theta_0}^T d\nu . \quad (1.13)$$

L'inégalité d'information pour le modèle $\mathcal{P} = \{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ donne une borne inférieure pour la variance d'un estimateur de paramètre $T(X)$ basée sur l'information de Fisher. Sous des conditions de régularité classiques ce résultat est connu sous le nom de *borne de Cramér-Rao*. Le résultat correspondant basé sur des conditions de différentiabilité de Hellinger, tel que formulé par Pollard (2001) est donné ci-dessous.

Theorem 1.4. *Soit $\mathcal{P} = \{P_\theta, \theta \in \Theta\}$ différentiable au sens de Hellinger en un point intérieur θ_0 de Θ avec dérivée $\dot{\xi}_{\theta_0}$. Si $T(X)$ est un estimateur vérifiant*

$$\sup_{\theta \in U_0} \mathbb{E}_\theta [T(X)^2] < \infty ,$$

pour un voisinage U_0 de θ_0 , alors $\theta \mapsto \gamma_\theta \equiv \mathbb{E}_\theta[T(X)]$ a une dérivée en θ_0 donnée par

$$\nabla_{\theta} \gamma_{\theta_0} = 2 \int \xi_{\theta_0} \dot{\xi}_{\theta_0} T d\nu .$$

Si, en plus, la matrice d'information de Fisher I_{θ_0} définie par (1.13) est non singulière, alors

$$\text{Var}_{\theta_0}(T(X)) \geq \nabla_{\theta} \gamma_{\theta_0} I_{\theta_0}^{-1} \nabla_{\theta} \gamma_{\theta_0} . \quad (1.14)$$

La preuve de ce résultat est reprise dans Appendice A de ce document.

1.5 MODÈLES DE MÉLANGE DE DISTRIBUTIONS

Puisque les mélanges de lois exponentielles sont un thème récurrent dans cette thèse, nous rappelons quelques aspects généraux des modèles de mélange de distributions comme l'identifiabilité ainsi que des approches classiques d'estimation, en l'occurrence l'algorithme E.M. et l'échantillonneur de Gibbs. D'ailleurs, nous montrerons que l'on peut adapter ces deux techniques au problème d'estimation dans le modèle d'empilement (voir Chapitre 2 pour l'échantillonneur de Gibbs et Chapitre 3 pour un algorithme E.M. modifié dans une approche de maximum de vraisemblance).

Soit $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ une collection paramétrique de densités. Alors une densité de *mélange fini* est de la forme

$$\sum_{k=1}^K \alpha_k f_{\theta_k} , \quad (1.15)$$

pour des paramètres $\theta_k \in \Theta$ et des poids de mélange $(\alpha_1, \dots, \alpha_K)^T$ vérifiant $\sum_{k=1}^K \alpha_k = 1$ et $\alpha_k > 0$. Le nombre de composantes du mélange K est appelé l'*ordre de mélange*.

Grâce à leur grande flexibilité, les modèles de mélange fini sont très utiles pour décrire une large variété de phénomènes aléatoires. Ils modélisent diverses situations réelles, où des mesures proviennent de différentes populations qui ont toutes des distributions différentes. De plus, les

modèles de mélange définissent de nouvelles classes de distributions comme par exemple des densités asymétriques (un mélange de deux lois gaussiennes peut donner lieu à une densité asymétrique). Un autre exemple d'apparition de modèles de mélange est l'estimation non paramétrique de densités via des méthodes à noyau. Si le noyau est une densité de probabilité, l'estimateur à noyau basé sur n observations i.i.d. est un mélange de n distributions avec des poids de mélanges égaux. En effet, Marron & Wand (1992) utilise la famille de mélanges de lois gaussiennes pour représenter une large variété de forme de densités. Par conséquent, en fonction de l'ordre de mélange, on peut considérer que les modèles de mélange représentent un pont entre l'estimation paramétrique et non paramétrique.

Une représentation alternative de mélanges finis de distributions est basée sur la *distribution mélangeante*. Soit μ une mesure de probabilité définie sur Θ avec des points de support θ_k et $\mu(\theta_k) = \alpha_k$. Alors

$$\int_{\Theta} f_{\theta} d\mu(\theta) \tag{1.16}$$

est équivalent à (1.15). Cette représentation de mélanges finis suggère une généralisation directe en permettant à μ d'être une mesure de probabilité quelconque sur Θ . Si par exemple μ admet une densité α par rapport à la mesure de Lebesgue, alors (1.16) s'écrit

$$\int_{\Theta} f_{\theta} \alpha(\theta) d\theta ,$$

et cette densité correspond au mélange d'un nombre infini de composantes. Il s'agit alors de la densité d'un *mélange infini*.

Nous renvoyons le lecteur aux ouvrages de Titterington *et al.* (1985) et McLachlan & Peel (2000) pour une présentation détaillée des modèles de mélange de distributions et pour de nombreux exemples d'application.

1.5.1 IDENTIFIABILITÉ DES MODÈLES DE MÉLANGE

Pour que le problème d'estimation de la loi mélangeante soit bien posé, il faut éclairer la question d'identifiabilité des mélanges de distributions. En général, on dit qu'une famille $\{\mathbb{P}_{\theta}\}$ est identifiable, si $\mathbb{P}_{\theta} = \mathbb{P}_{\theta'}$ implique toujours $\theta = \theta'$. Cependant, dans le cas de mélange fini avec le vecteur de paramètres $\theta = (\theta_1, \dots, \theta_K, \alpha_1, \dots, \alpha_K)^T$, cette définition de l'identifiabilité ne s'applique pas parce que les composantes du mélange sont interchangeable.

En revanche, la représentation (1.16) des mélanges basée sur la notion de la loi mélangeante est adéquate pour traiter la question de l'identifiabilité. Notons par \mathbb{P}_{μ} la distribution de mélange associée à la mesure de probabilité μ sur Θ et par \mathcal{M} un ensemble de mesures de probabilité sur Θ . On dit alors que $\{\mathbb{P}_{\mu}, \mu \in \mathcal{M}\}$ est *identifiable* si $\mathbb{P}_{\mu} = \mathbb{P}_{\mu'}$ implique $\mu = \mu'$.

Teicher (1961) donne des conditions suffisantes d'identifiabilité d'un mélange de lois caractérisées par un paramètre de translation ou de dilatation, lorsque \mathcal{M} est l'ensemble de toutes les mesures de probabilité sur Θ . Il en résulte, en particulier, que la classe de mélange de lois exponentielles est identifiable. Enfin, des conditions nécessaires et suffisantes pour l'identifiabilité de l'ensemble de tous les mélanges finis d'une famille paramétrique, c'est-à-dire \mathcal{M} est l'ensemble de toutes les mesures à support fini, sont données dans Teicher (1963). Les résultats de Teicher sont généralisés dans Chandra (1977).

Bien que la plupart des familles de modèles de mélange soient identifiables, le problème d'estimation des paramètres d'un mélange fini appartient à la classe des *problèmes mal posés*, dans le sens où deux paramètres très différents peuvent donner lieu à des distributions de mélange similaires. Par conséquent, l'estimation de paramètres est très difficile et il arrive que plusieurs choix de paramètres « expliquent » bien les données. Par ailleurs, ce problème d'estimation est mal posé, car la probabilité qu'il y ait une composante du mélange qui n'ait généré aucune des n observations d'un échantillon fini est non nulle. Dans ce cas, les observations ne contiennent aucune information sur cette composante du mélange et son paramètre. Ceci explique pourquoi la fonction de vraisemblance peut être non bornée et donc pourquoi des lois a priori non informatives sont délicates à utiliser dans ce contexte.

1.5.2 ESTIMATION DANS DES MODÈLES DE MÉLANGE FINI

Alors que des modèles de mélange sont très appréciés pour leurs capacités de modélisation, le calcul des estimateurs a longtemps été une difficulté majeure. Pearson (1894) qui était parmi les premiers à utiliser des modèles de mélange (Stigler, 1986, voir Chapitre 10), a introduit un mélange de deux gaussiennes pour l'étude des mesures du rapport du front des crabes et la longueur de leurs corps. Son estimateur de moments a nécessité le calcul de toutes les racines d'un polynôme de degré neuf, et Pearson a réussi cet exploit sans l'aide d'un ordinateur !

Cependant, ce n'est pas l'apparition d'ordinateurs de grande capacité de calcul qui a résolu de manière générale le problème d'estimation. La révolution dans l'utilisation des modèles de mélange est survenue avec l'introduction du concept des *variables manquantes* ou des *variables latentes*. Cette notion est fondée sur l'idée qu'un modèle de mélange modélise le comportement de plusieurs populations. La variable manquante d'une observation est alors l'étiquette de la population d'où vient l'observation, ou autrement dit, l'étiquette de la composante de mélange qui a généré l'observation. Cette étiquette n'est généralement pas observée, d'où le nom de variable manquante. L'avantage des variables latentes est le fait que leur introduction dans le modèle de mélange simplifie en général énormément les formules mathématiques. D'ailleurs, l'algorithme E.M. ainsi que l'échantillonneur de Gibbs sont fondés sur le concept des variables manquantes. Pour plus de détails sur la notion de variables manquantes nous renvoyons à l'ouvrage de Little & Rubin (2002).

L'algorithme E.M.

L'algorithme E.M. développé par Dempster *et al.* (1977) vise à calculer l'estimateur de maximum de vraisemblance dans un modèle statistique avec des variables manquantes comme dans les modèles de mélange fini. On considère un modèle statistique avec deux vecteurs aléatoires X et Y où uniquement X est observable. Notons par p_θ la densité jointe de (X, Y) et par f_θ la densité marginale de X . L'estimateur de maximum de vraisemblance est défini comme le point où la fonction de log-vraisemblance associée aux données incomplètes $L(\theta) = \log f_\theta(X)$ est maximal. Alors que la maximisation de $L(\theta)$ est souvent infaisable, il est en général plus facile de maximiser la log-vraisemblance associée aux données complètes $\tilde{L}(\theta) = \log p_\theta(X, Y)$. Puisque Y est inconnue, dans l'algorithme E.M., une itération consiste à maximiser l'espérance de $\tilde{L}(\theta)$ où l'espérance est évaluée par rapport à la distribution $\mathbb{P}_{\theta^{(t)}}$ avec $\theta^{(t)}$ la valeur actuelle du paramètre. Autrement dit, une itération de l'algorithme E.M. comprend une *étape E* pour calculer l'espérance

et une *étape M* de maximisation. Ceci explique le nom de l'algorithme qui vient de l'anglais *expectation-maximization*.

Etape E. Calculer la quantité intermédiaire $Q(\theta, \theta^{(t)}) = \mathbb{E}_{\theta^{(t)}} [\log p_{\theta}(X, Y) | X]$.

Etape M. Déterminer la nouvelle valeur de paramètre $\theta^{(t+1)}$ qui maximise la fonction $\theta \mapsto Q(\theta, \theta^{(t)})$.

La suite $(\theta^{(t)})_t$ générée par l'algorithme E.M. converge vers l'estimateur de maximum de vraisemblance sous des conditions convenables, notamment quand la fonction de vraisemblance est unimodale (Wu, 1983). Or, dans des modèles de mélange fini l'interchangeabilité des composantes implique que la fonction de vraisemblance est multimodale. Par conséquent, l'initialisation de l'algorithme E.M. est décisive pour la convergence vers l'estimateur de maximum de vraisemblance ou vers un maximum local. Une difficulté supplémentaire est le critère d'arrêt, car la convergence de l'algorithme E.M. peut être très lente, surtout si le nombre de variables manquantes est élevé. Le lecteur peut trouver plus de détails sur l'algorithme E.M. appliqué aux mélanges de distributions dans Redner & Walker (1984).

Echantillonneur de Gibbs

L'échantillonnage de Gibbs est une technique pour calculer des estimateurs bayésiens. Il est particulièrement adapté aux modèles aux données incomplètes comme des mélanges finis. L'échantillonneur de Gibbs appartient à la classe de méthodes MCMC (*Markov Chain Monte-Carlo*), qui sont des méthodes d'échantillonnage d'une loi de probabilité. L'idée derrière l'échantillonneur de Gibbs est de construire une chaîne de Markov dont la loi stationnaire est la loi requise. Des descriptions détaillées sont données dans Robert & Casella (2004) et Marin & Robert (2007).

L'inférence bayésienne est basée sur la loi a posteriori $p(\theta|X)$ du vecteur de paramètres $\theta = (\theta_1, \dots, \theta_m)^T$ sachant les observations X . Alors qu'il est en général difficile de tirer des observations directement d'une distribution multivariée, il est souvent relativement simple d'utiliser les distributions marginales a posteriori. L'échantillonneur de Gibbs génère alors une par une des observations de la loi conditionnelle de chaque paramètre $p(\theta_j|X, \theta_k, k \neq j)$ sachant les valeurs actuelles des autres paramètres et les observations X . On peut montrer que la séquence d'échantillons ainsi générée constitue une chaîne de Markov, et sa loi stationnaire est la densité jointe $p(\theta|X)$, voir, par exemple, Gelman *et al.* (2003), Chapitre 11.

Lorsqu'un modèle contient des variables latentes, l'échantillonneur de Gibbs inclut typiquement une *étape d'augmentation de données* comme décrit dans Tanner & Wong (1987). En ajoutant des variables latentes, disons Y , on peut simplifier la structure des distributions marginales a posteriori. Dans le cas où X est une observation d'un modèle de mélange fini défini par (1.15) et $Y \in \{1, \dots, K\}$ est l'étiquette de la composante de mélange qui a produit X , on a

$$p(\theta_k|X = x, Y = y, \theta_j, j \neq k) \propto \alpha_y f_{\theta_y}(x) \pi(\theta),$$

où π désigne la loi a priori de θ . Il est donc nécessaire de choisir π tel que les lois a posteriori $p(\theta_k|X = x, Y = y, \theta_j, j \neq k)$ soient facile à simuler.

Dans un modèle général aux données incomplètes, l'échantillonneur de Gibbs comprend les deux étapes suivantes, répétées un grand nombre de fois.

Augmentation de données. Générer des données manquantes $Y^{(t+1)}$ selon la loi conditionnelle

$$Y^{(t+1)} \sim p(y|X, \theta^{(t)}).$$

Simulation de paramètres. Générer le nouveau vecteur de paramètres

$$\theta^{(t+1)} = (\theta_1^{(t+1)}, \dots, \theta_m^{(t+1)})^T$$

en tirant les paramètres un par un selon les lois suivantes

$$\begin{aligned} \theta_1^{(t+1)} &\sim p(\theta_1 | X, Y^{(t+1)}, \theta_2^{(t)}, \theta_3^{(t)}, \dots, \theta_m^{(t)}) \\ \theta_2^{(t+1)} &\sim p(\theta_2 | X, Y^{(t+1)}, \theta_1^{(t+1)}, \theta_3^{(t)}, \dots, \theta_m^{(t)}) \\ &\vdots \\ \theta_m^{(t+1)} &\sim p(\theta_m | X, Y^{(t+1)}, \theta_1^{(t+1)}, \theta_2^{(t+1)}, \dots, \theta_{m-1}^{(t+1)}) . \end{aligned}$$

Bien que la loi stationnaire de la chaîne de Markov $(\theta^{(t)})_t$ soit la loi a posteriori $p(\theta|X)$ désirée, il est nécessaire de contrôler la convergence de l'algorithme et de développer des critères d'arrêt appropriés. Quant aux modèles de mélange, un problème supplémentaire est celui de *label switching* dû à l'invariance des modèles de mélange par rapport à la permutation des indices des composantes. Il est alors impossible de distinguer les composantes à partir de la fonction de vraisemblance. Par conséquent, si l'on utilise une loi a priori symétrique en $(\theta_1, \dots, \theta_K)$, toutes les lois marginales en θ_k seront identiques, ce qui implique que l'espérance a posteriori de θ_1 est identique à celle de θ_2 . On peut résoudre ce problème en introduisant une structure de dépendance entre les composantes ou en imposant des contraintes d'identifiabilité sur les paramètres. Pour plus de détails sur l'échantillonneur de Gibbs dans le contexte des modèles de mélange voir Marin *et al.* (2005). Un échantillonneur de Gibbs adapté aux mélanges exponentiels est présenté dans Gruet *et al.* (1999).

1.5.3 ESTIMATION DANS DES MODÈLES DE MÉLANGE INFINI

Les mélanges infinis définis par (1.16), aussi appelés mélanges non paramétriques, définissent de très larges familles de distributions. Dans beaucoup d'application les composantes f_θ d'un mélange infini n'ont pas de signification physique. Cependant, les mélanges infinis permettent une grande flexibilité de modélisation. Un exemple, connu de la littérature en fluorescence, sont les mélanges de lois exponentielles considérés comme un modèle approprié pour les fonctions de déclin photophysique (Ware *et al.*, 1973). Un autre exemple sont des mélanges de lois uniformes $U(0, \theta)$ qui contiennent toutes les densités décroissantes dont le support est \mathbb{R}_+ (Feller, 1971, p. 158).

Le problème d'estimation standard est l'identification de la loi mélangeante μ à partir d'un nombre fini d'observations X_1, \dots, X_n indépendantes de la densité de mélange f_μ définie par

$$f_\mu(x) = \int_{\Theta} f_\theta(x) d\mu(\theta) .$$

On distingue deux grandes approches d'estimation de la loi mélangeante μ . Dans une première, l'estimateur de maximum de vraisemblance non paramétrique fournit une solution discrète, ce qui revient à approcher un mélange infini par un mélange fini. Dans une seconde, des estimateurs réguliers de la densité mélangeante sont obtenus par des approches fonctionnelles.

Estimateur de maximum de vraisemblance non paramétrique

Le NPMLE (de l'anglais *NonParametric Maximum Likelihood Estimator*) est défini comme le point de maximum de la log-vraisemblance

$$L(\mu) = \sum_{i=1}^n \log f_{\mu}(X_i),$$

où le maximum est évalué sur l'ensemble de mesures de probabilité μ sur Θ . Des propriétés diverses du NPMLE sont étudiées dans Kiefer & Wolfowitz (1956); Laird (1978); Lindsay (1983, 1995). Il est notamment remarquable que, tant que la vraisemblance est bornée, le NPMLE de la loi mélangeante μ est concentré sur un ensemble de cardinal inférieur ou égal au nombre d'observations n . Une explication heuristique de ce résultat surprenant est basée sur le fait que chacune des n observations a été générée par une seule composante, disons f_{θ_i} . Le NPMLE essaie alors d'expliquer les observations par un mélange fini avec au plus n composantes.

En conséquence de ce résultat, un problème d'estimation non paramétrique potentiellement très difficile est transformé en un problème simple de dimension finie. Ce résultat implique que l'on peut calculer le NPMLE par des techniques connues de la théorie des modèles de mélanges finis. La manière la plus simple de calculer le NPMLE consiste à évaluer un estimateur adapté aux mélanges finis pour différents ordres de mélange. Ensuite, l'ordre de mélange est sélectionné d'après un certain critère (Laird, 1978). C'est ainsi, par exemple, que Jewell (1982) applique l'algorithme E.M. pour estimer les paramètres d'un mélange exponentiel en commençant avec un petit nombre de composantes. Puis il augmente successivement l'ordre de mélange tant que la vraisemblance continue à augmenter. Cependant, cette procédure a l'inconvénient de surestimer l'ordre de mélange.

Une alternative consiste à considérer un modèle de mélange avec un très grand nombre de composantes θ_k tous supposés connus et fixés de sorte que seuls les poids de mélange α_k sont à estimer. Laird (1978) propose, dans ce cas, d'appliquer l'algorithme E.M. Cependant, la convergence de l'algorithme E.M. est extrêmement lente, surtout quand la solution exige quelques poids égaux à 0. En effet, l'algorithme ne peut jamais atteindre des points sur le bord de l'espace de paramètres. Il est donc impossible que l'ordre de mélange soit réduit au cours du calcul en éliminant des composantes. Au regard de ces difficultés, Pilla & Lindsay (2001) proposent un algorithme E.M. alternatif fondé sur une accélération de l'algorithme E.M. classique grâce à une reparamétrisation successive. Cet algorithme permet, en plus, d'éliminer des composantes de mélange diminuant ainsi l'ordre de mélange. D'autres procédures d'estimation, par exemple basées sur un critère de gradient, sont présentées dans Lindsay (1995) et Böhning (2000).

Approches fonctionnelles

Le NPMLE est certainement une approche satisfaisante dans de nombreuses applications. Cependant, il est insatisfaisant si l'on fait l'hypothèse que la densité α de la loi mélangeante μ appartient à une classe de fonctions régulières \mathcal{F} et un estimateur à valeurs dans cette classe \mathcal{F} est désiré. On distingue principalement deux approches fonctionnelles pour construire des estimateurs réguliers de la densité mélangeante α : des méthodes à noyau et des estimateurs basés sur des séries orthogonales.

Dans les travaux de Zhang (1990, 1995) des estimateurs à noyau pour des densités mélangeantes d'un paramètre de translation sont proposés. Ces estimateurs utilisent des transformées de Fourier.

En revanche, Goutis (1997) propose une procédure d'estimation itérative basée sur des méthodes à noyau en utilisant des variables latentes similaire à l'algorithme E.M.

Quant à l'approche basée sur des séries orthogonales, l'hypothèse principale est que la densité mélangeante α appartienne à un espace de Hilbert \mathbb{H} séparable. La densité mélangeante α admet dans ce cas une représentation en série orthogonale de la forme

$$\alpha = \sum_{k=1}^{\infty} \beta_k \psi_k ,$$

où $(\psi_k)_k$ désigne une base orthonormée de \mathbb{H} et $\beta_k = \langle \alpha, \psi_k \rangle$, $\langle \cdot, \cdot \rangle$ étant le produit scalaire de \mathbb{H} . Des estimateurs de la densité mélangeante sont obtenus en estimant les m premiers coefficients β_k . Pour des mélanges de lois discrètes, où f_θ est une densité par rapport à la mesure de comptage sur un espace discret, des estimateurs par séries orthogonales ont été développés et étudiés par Hengartner (1997) et Roueff & Ryden (2005). Au Chapitre 4 de cette thèse nous développerons un estimateur par séries orthogonales pour des densités mélangeantes d'un *scale mixture* de densités f_θ par rapport à la mesure de Lebesgue sur \mathbb{R}_+ . Cet estimateur est particulièrement adapté à des mélanges de lois exponentielles.

Pour l'évaluation de la qualité d'un estimateur de densité, on peut utiliser la notion du risque. Pour cela, soient ℓ une fonction de perte et $\hat{\alpha}_n$ un estimateur de la densité inconnue α basé sur un échantillon de n observations. Le *risque* de l'estimateur $\hat{\alpha}_n$ est donné par $\mathbb{E}_\alpha[\ell(\hat{\alpha}_n - \alpha)]$. Si α et $\hat{\alpha}_n$ appartiennent à un espace normé \mathbb{H} , on peut utiliser comme fonction de perte ℓ la norme au carré $\|\cdot\|_H^2$. Dans ce cas, on appelle le risque associé l'*erreur quadratique moyenne intégrée* ou MISE de l'anglais *mean integrated squared error* donné par

$$MISE \equiv \mathbb{E}_\alpha [\|\hat{\alpha}_n - \alpha\|_H^2] .$$

On définit, en plus, le *risque minimax* par

$$\inf_{\hat{\alpha}_n} \sup_{\alpha \in \mathcal{F}} \mathbb{E}_\alpha [\|\hat{\alpha}_n - \alpha\|_H^2] ,$$

où l'infimum est évalué sur l'ensemble des estimateurs $\hat{\alpha}_n$ basés sur n observations (Wasserman, 2007). Le risque minimax donne une borne optimale pour la classe de fonctions \mathcal{F} . Deux questions se posent : Quelle est la valeur du risque minimax ? Et peut-on trouver un estimateur qui atteint le risque minimax ? Dans la plupart des cas, on ne peut étudier que le comportement asymptotique du risque minimax. On cherche alors à déterminer la vitesse de convergence du risque minimax que l'on compare à la vitesse de convergence du *MISE*.

Le Chapitre 4 de ce manuscrit contient une étude du risque minimax de l'estimateur par séries orthogonales pour des mélanges exponentiels que nous avons proposé. Nous montrons que cet estimateur atteint la vitesse minimax sur certains espaces de fonctions régulières.

1.6 PRINCIPAUX RÉSULTATS DE LA THÈSE

Nous clôturons ce chapitre introductif en présentant brièvement les différentes contributions obtenues dans cette thèse.

1.6.1 ÉTUDE DE L'INFORMATION DANS LE MODÈLE D'EMPILEMENT

L'objectif de Chapitre 2 est de confirmer notre intuition selon laquelle il serait possible d'améliorer la technique TCSPC en utilisant des données où l'effet d'empilement est bien présent, contrairement aux mesures TCSPC habituelles où celui est négligeable. Dans ce but, nous étudions l'information de Fisher associée au modèle d'empilement et la borne de Cramér-Rao pour éclairer l'impact de l'effet d'empilement.

Lorsque λ désigne le paramètre de la loi de Poisson, nous montrons d'abord que l'information associée au modèle d'empilement décroît quand λ tend vers 0. Ceci confirme notre intuition qu'il est défavorable d'acquérir les données à basse intensité λ . Si, en plus, $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ est la famille de densités exponentielles, nous montrons que, d'une part, la borne de Cramér-Rao de θ est minimale pour une valeur de λ relativement élevée, et d'autre part, cette valeur optimale de λ est indépendante de la valeur de θ . Cette valeur optimale est déterminée numériquement, et elle peut alors servir en TCSPC pour régler l'intensité de laser de manière optimale. Concernant des lois initiales multiexponentielles, l'étude de la borne de Cramér-Rao montre que la valeur optimale de λ dépend de θ . Néanmoins, nous pouvons identifier un intervalle de valeurs de λ qui est très favorable pour augmenter significativement l'information comparé au cas où λ est proche de 0.

Puisque l'étude de l'information suggère d'effectuer les mesures de fluorescence à des intensités relativement élevées, les données sont fortement empilées et, par conséquent, un estimateur qui prend en compte l'effet d'empilement est requis. A cette fin, nous développons dans la deuxième partie du Chapitre 2 un échantillonneur de Gibbs pour le modèle d'empilement. L'étape d'augmentation des données de l'algorithme est fondée sur une nouvelle structure de variables manquantes qui est appropriée au modèle d'empilement. Nous proposons aussi un outil pour contrôler la convergence de l'algorithme basé sur des *Rao-Blackwellized Riemann control variates*. Des simulations pour une loi initiale monoexponentielle montrent que l'échantillonneur de Gibbs est efficace. En effet, l'estimateur atteint la borne de Cramér-Rao pour toute intensité $\lambda > 0$. D'autres simulations comparant la performance de l'échantillonneur de Gibbs à celle de la méthode habituelle en TCSPC révèlent qu'une réduction du temps d'acquisition d'un facteur 10 est envisageable.

Malgré la très bonne performance de l'échantillonneur de Gibbs sur des données synthétiques, l'estimateur n'est pas adapté aux mesures réelles de fluorescence. Les inconvénients de l'échantillonneur de Gibbs incluent le fait qu'il est très gourmand en temps de calcul et qu'il est construit spécifiquement pour des lois initiales mono- et multiexponentielles. En conséquence, il serait favorable de disposer d'une approche d'estimation plus générale qui s'applique à une grande variété de distributions et dont le temps de calcul est plus rapide.

1.6.2 ESTIMATION PARAMÉTRIQUE BASÉE SUR LA VRAISEMBLANCE

Au Chapitre 3 nous développons une approche d'estimation générale pour estimer les paramètres de la loi initiale dans le modèle d'empilement. Nous utilisons une approche de maximum de vraisemblance fondée sur un nouveau contraste. La complexité de calcul de cet estimateur est en général la même que celle de l'estimateur de maximum de vraisemblance classique pour le modèle initial. En particulier, si l'algorithme E.M. s'applique au modèle initial, alors un algorithme de type E.M. peut être utilisé pour calculer l'estimateur ici proposé.

Nous proposons un contraste qui est une approximation de la log-vraisemblance du modèle initial basée sur des observations empilées. Ce contraste peut être écrit sous la forme d'une L -statistique, c'est-à-dire une somme pondérée des statistiques d'ordre des observations. La pondération est censée « corriger » l'effet d'empilement. L'estimateur est défini comme le point de maximum de cette log-vraisemblance « corrigée », et nous l'appelons l'*estimateur de maximum de vraisemblance corrigée* (EMVC).

Nous montrons sous des conditions faibles que l'EMVC est un estimateur consistant du vecteur θ de paramètres de la loi initiale. De plus, nous fournissons des conditions sous lesquelles la loi limite de l'EMVC est gaussienne. Dans ce but, nous avons développé dans l'Appendice B un théorème limite central pour des L -statistiques qui s'applique aux L -statistiques qui apparaissent dans notre contexte. Puisque ce théorème limite est basé sur la méthode delta fonctionnelle, on obtient une expression explicite de la variance limite, ce qui est utile pour la construction d'intervalles de confiance.

Nous soulignons que ce nouvel estimateur est non seulement bien défini pour toute famille de densités $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ et pour toute loi discrète de p_λ , mais aussi que sa complexité de calcul est du même ordre que celle de l'estimateur de maximum de vraisemblance classique pour le modèle initial. Dans le cas monoexponentielle, par exemple, le problème de maximisation a une solution explicite. Ou encore, si l'algorithme E.M. s'applique au modèle initial, alors un algorithme de type E.M. peut être utilisé pour calculer l'EMVC. Ceci est particulièrement important pour la fluorescence où on utilise surtout des mélanges exponentiels perturbés par un bruit additif. De plus, si les données sont fournies sous forme d'un histogramme, ce qui est le cas en TCSPC, il est possible d'accélérer l'algorithme E.M. de sorte qu'il devient particulièrement rapide sur des grands échantillons.

Une étude numérique met en évidence la bonne performance de l'EMVC. Appliqué sur des données synthétiques ou sur des mesures TCSPC réelles, l'EMVC fournit des valeurs estimées de paramètre avec beaucoup de précision. En particulier, l'EMVC paraît très bien adapté aux modèles de mesures utilisés en TCSPC, comme la loi multiexponentielle polluée par un bruit additif. Les simulations dans le cas monoexponentiel montrent également que l'EMVC atteint la borne de Cramér-Rao pour un large domaine du paramètre poissonnien λ . Et comme la borne de Cramér-Rao est décroissante sur ce domaine, on déduit que l'on peut réduire le temps d'acquisition en appliquant l'EMVC sur des données empilées. En effet, ceci est confirmé par une comparaison de la méthode habituelle en TCSPC pour des mesures non empilées avec l'EMVC appliquées sur des données empilées. Nous observons qu'avec l'EMVC on peut atteindre une réduction significative du temps d'acquisition, plus précisément une réduction d'un facteur 10.

Finalement, si la loi initiale est un mélange infini de distributions, nous montrons que l'EMVC peut être utilisé pour calculer le NPML qui est un estimateur de la loi mélangeante. Pour cela, nous proposons d'inclure le schéma d'accélération proposé par Pilla & Lindsay (2001) dans l'algorithme E.M. modifié pour calculer l'EMVC sur une large grille de paramètres fixés. Sa

performance est comparable à celle de l'algorithme proposé par Pilla & Lindsay (2001).

1.6.3 ESTIMATION NON PARAMÉTRIQUE PAR DES SÉRIES ORTHOGONALES

Le Chapitre 4 est consacré aux mélanges infinis de distributions et à l'estimation non paramétrique de la densité mélangeante. La densité mélangeante est supposée appartenir à une classe de fonctions régulières. Nous nous intéressons aux mélanges de lois caractérisées par un paramètre de dilatation, c'est-à-dire aux *scale mixtures*, notamment aux mélanges infinis de lois exponentielles. Dans ce chapitre, nous proposons un estimateur par projection en construisant des estimateurs des coefficients de la série orthogonale représentant la densité mélangeante.

Nous développons des bornes supérieures de l'erreur quadratique intégrée moyenne ainsi que des bornes inférieures du risque minimax qui s'appliquent dans des contextes divers. Dans le cas d'un mélange infini de lois exponentielles, nous montrons que l'estimateur par projection est optimal dans le sens qu'il atteint la vitesse minimax sur des espaces de régularité spécifiques.

Une étude numérique met en évidence que l'estimateur par projection fournit de bons résultats d'estimation. Cependant il est nécessaire de bien choisir l'ordre d'approximation, c'est-à-dire le nombre de coefficients estimés. L'estimateur montre une bonne performance pour une variété de modèles comme des mélanges infinis de lois exponentielles, uniformes ou beta.

Par ailleurs, l'estimateur projection peut être adapté aux observations d'un modèle d'empilement où la loi initiale est un mélange infini. Comme dans le Chapitre 3, on peut remplacer des moyennes empiriques du modèle initial par des sommes pondérées de statistiques d'ordre des observations empilées, c'est-à-dire par des L -statistiques. Des simulations montrent que la performance de l'estimateur par projection adapté au modèle d'empilement est similaire à celui pour un mélange infini sans distorsion.

1.6.4 PUBLICATIONS

Nos résultats sont partiellement publiés ou soumis pour publication. En particulier, notre échantillonneur de Gibbs pour le modèle d'empilement est présenté dans les actes du colloque GRETSI 2007 (Rebafka, 2007). L'étude de la borne d'information est soumise à une revue internationale (Rebafka *et al.*, 2008). Un article sur la construction du nouvel estimateur EMVC et une évaluation numérique de sa performance apparaîtra dans les actes du colloque GRETSI 2009 (Rebafka *et al.*, 2009b). L'étude du comportement asymptotique de l'EMVC et le théorème limite central pour des L -statistiques est soumis pour publication dans une revue internationale (Rebafka *et al.*, 2009a). L'application de cet estimateur dans le contexte des mesures de la fluorescence a fait l'objet d'un brevet (Rebafka *et al.*, 2009c). Finalement, un article sur l'estimateur non paramétrique par projection pour l'estimation de la densité mélangeante d'un mélange infini de lois exponentielles est en cours de préparation (Rebafka & Roueff, 2009).

CHAPTER 2

INFORMATION BOUNDS FOR THE PILE-UP MODEL AND AN EFFICIENT GIBBS SAMPLER

An observation of the *pile-up model* is given by the minimum of a random number of independent variables from the target distribution. The information of observations from the pile-up model on the unknown parameters varies with the distribution of the size of the groups over which the minimum is taken. The aim of this chapter is to show that pile-up affected observations can contain much more information than observations where the pile-up effect is negligible and that this is beneficial for parameter estimation. This is done by a study of the *Cramér-Rao bound*.

The Cramér-Rao bound is well-defined for regular models, where regularity can be defined by *Hellinger differentiability* conditions, see Section 1.4. We provide simple sufficient conditions for the pile-up model to be Hellinger differentiable.

In view of the application on fluorescence lifetime measurements we focus on single- and multi-exponential target distributions and on Poisson group-size distributions. In the single-exponential case a uniformly optimal value of the Poisson parameter that minimizes the Cramér-Rao bound for any value of the exponential parameter is derived. This result is of great practical use in the fluorescence set-up where the Poisson parameter is roughly controlled by the user through the laser intensity. Thus, without knowledge of the exponential parameter, data collection can be accomplished at the optimal intensity. As the optimal value widely exceeds the intensity typically used in fluorescence, reduction of the variance of estimators may be possible, or equivalently the acquisition time can be reduced. In the multi-exponential case the results on the information bounds also indicate that far higher values of the Poisson parameter increase the information on the parameters of interest.

In the second part of this chapter an efficient parameter estimate is presented that achieves the Cramér-Rao bound. We propose a *Gibbs sampler* that is well-adapted to the pile-up model with multi-exponential target distribution and Poisson group-size distribution. The Gibbs sampler is an extrapolation of the Gibbs sampler for multi-exponential observations developed by Gruet *et al.* (1999), but with a more sophisticated choice of the latent variables to confront the problem of the pile-up effect. *Rao-Blackwellized Riemann control variates* are developed to control the convergence of the algorithm. Simulation results show that the Gibbs sampler achieves the Cramér-Rao bound for any value of the Poisson parameter. Moreover, the simulations illustrate the significant

improvement of the estimation quality when the optimal Poisson parameter is used in comparison to the intensity usually used for fluorescence lifetime measurements. Consequently, there is evidence that a good choice of the laser intensity results in a considerable reduction of the acquisition time.

2.1 REGULARITY OF THE PILE-UP MODEL

In this chapter we consider the pile-up model defined by (1.2) in a parametric setting. The most general setting that will be considered is the following.

Assumption 2.1. The distribution F belongs to a parametric family dominated by \mathcal{L}_+ and is thus described by a collection of densities $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ with parameter set $\Theta \subset \mathbb{R}^d$. The distribution of N belongs to a parametric family $\{p_\lambda, \lambda \in \Lambda\}$ where $\Lambda \subset \mathbb{R}$ and, for a given λ , $p_\lambda(k) = \mathbb{P}(N = k)$ for all $k \in \mathbb{N}$.

The following Lemma specifies the pile-up distribution. Furthermore, it states that under Assumption 2.1 the pile-up distribution G admits a density.

Lemma 2.1. *The distribution function G of Z is given by*

$$G(z) = 1 - M(1 - F(z)), \quad z \in \mathbb{R}_+, \quad (2.1)$$

where M is the probability generating function associated with N , defined as $M(u) = \mathbb{E}[u^N]$, for $u \in [0, 1]$. If F admits a density f , G admits a density g with respect to the measure $\overline{\mathcal{L}}_+$, defined as the measure on $\overline{\mathbb{R}}_+$ which puts mass 1 at $\{\infty\}$ and whose restriction on \mathbb{R}_+ is the Lebesgue measure \mathcal{L}_+ . Setting $\dot{M}(u) = \mathbb{E}[Nu^{N-1}]$ for all $[0, 1]$, the pile-up density g is given by

$$g(z) = \begin{cases} f(z)\dot{M}(1 - F(z)) & \text{if } z \in \mathbb{R}_+ \\ M(0) & \text{if } z = \infty. \end{cases} \quad (2.2)$$

The proof of the lemma can be found at the end of the chapter in Section 2.6, with all the other proofs of the results of this chapter.

Recall that according to Definition 1.1, under Assumption 2.1, the collection of densities obtained by Relation (2.2) $\{g_{\lambda, \theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ is referred to as the *pile-up model* associated with $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ and $\{p_\lambda, \lambda \in \Lambda\}$. According to the context, we will sometimes suppose that the distribution of N is known, say p_{λ_0} is the distribution of N . Then we consider the collection of pile-up densities $\{g_{\lambda_0, \theta}, \theta \in \Theta\}$.

Concerning the family of target densities $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$, three particular cases will be considered in this chapter: a *scale family* $f_\theta(t) = \theta f_1(\theta t)$ defined for all $\theta > 0$, the family of *exponential densities* which is the particular scale family with $f_1(t) = e^{-t}$, and the family of *multi-exponential densities* defined in (1.10). As we focus on the fluorescence application, the distribution of N that will be of special interest in this chapter is the *Poisson distribution*. Then the pile-up distribution and pile-up density are given by (1.7) and (1.8).

We now give some simple sufficient conditions for the pile-up model to be Hellinger differentiable and determine its Hellinger derivative, see Definition 1.2. The following theorem states that

if the underlying model $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ is Hellinger differentiable then the Hellinger differentiability is preserved under the pile-up effect provided that the model $\{p_\lambda, \lambda \in \Lambda\}$ satisfies some weak conditions. The following study of information bounds will mainly rely on this result.

Theorem 2.2. *Under Assumption 2.1 let $\{g_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ be the associated pile-up model. Define $\xi_\theta = \sqrt{f_\theta}$ and $\zeta_{\lambda,\theta} = \sqrt{g_{\lambda,\theta}}$ for all $\lambda \in \Lambda$ and $\theta \in \Theta$. Let $(\lambda_0, \theta_0) \in \Lambda \times \Theta$. If*

- (i) $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ is Hellinger differentiable with respect to \mathcal{L}_+ at θ_0 with Hellinger derivative $\dot{\xi}_{\theta_0}$,
- (ii) $\mathbb{E}_{\lambda_0}[N^3] = \sum_{k \geq 0} k^3 p_{\lambda_0}(k) < \infty$,
- (iii) $p_{\lambda_0}(1) > 0$,
- (iv) the function $\lambda \mapsto \{p_\lambda(k)\}_{k \geq 1}$ is differentiable at λ_0 as a function defined on Λ with values in the space of sequences $\ell_1 = \{(u_k)_{k \in \mathbb{N}} : \sum_{k \geq 1} k|u_k| < \infty\}$,
- (v) either (a) $p_{\lambda_0}(0) > 0$ and $\lambda \mapsto p_\lambda(0)$ is differentiable at λ_0 or (b) $p_\lambda(0) = 0$ for all λ in a neighbourhood of λ_0 ,

then $\{g_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ is Hellinger differentiable with respect to $\overline{\mathcal{L}}_+$ at (λ_0, θ_0) with Hellinger derivative

$$\dot{\zeta}_{\lambda_0, \theta_0} = [\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0} \quad \partial_\lambda \zeta_{\lambda_0, \theta_0}]^T, \quad (2.3)$$

where

$$\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(z) = \begin{cases} \dot{\xi}_{\theta_0}(z) \dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_{\theta_0}(z)) + \frac{\xi_{\theta_0}(z) \ddot{M}_{\lambda_0}(1 - F_{\theta_0}(z))}{\dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_{\theta_0}(z))} \int_z^\infty \xi_{\theta_0}(t) \dot{\xi}_{\theta_0}(t) dt & \text{if } z \in \mathbb{R}_+ \\ 0 & \text{if } z = \infty, \end{cases} \quad (2.4)$$

with $\dot{M}_\lambda(u) = \mathbb{E}_\lambda(Nu^{N-1})$ and $\ddot{M}_\lambda(u) = \mathbb{E}_\lambda\{N(N-1)u^{N-2}\}$. Further

$$\partial_\lambda \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(z) = \begin{cases} \frac{\xi_{\theta_0}(z) \dot{M}_{\lambda_0}(1 - F_{\theta_0}(z))}{2\dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_{\theta_0}(z))} & \text{if } z \in \mathbb{R}_+ \\ \frac{\check{p}_{\lambda_0}(0)}{2p_{\lambda_0}^{1/2}(0)} & \text{if } z = \infty, \end{cases} \quad (2.5)$$

with the convention $0/0 = 0$ and where $\check{p}_{\lambda_0}(k)$ denotes the derivative of $\lambda \mapsto p_\lambda(k)$ at λ_0 and

$$\check{M}_{\lambda_0}(u) = \sum_{k=1}^{\infty} k u^{k-1} \check{p}_{\lambda_0}(k), \quad u \in [0, 1]. \quad (2.6)$$

Remark 2.3. The pile-up model $\{g_{\lambda_0, \theta}, \theta \in \Theta\}$ parameterized by θ with a given λ_0 is Hellinger differentiable at a point θ_0 under the conditions (i)–(iii) and the Hellinger derivative $\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0}$ is given by (2.4), see the proof of the Theorem.

Remark 2.4. Condition (iv) implies that, for all $k \geq 1$, $\lambda \mapsto p_\lambda(k)$ is differentiable at λ_0 , and that the sequence made of their derivatives $(\check{p}_{\lambda_0}(k))_{k \geq 1}$ belongs to ℓ_1 . Hence $\check{M}_{\lambda_0}(u)$ is well defined in (2.6) and is equal to the derivative of $\lambda \mapsto \dot{M}_\lambda(u)$ at λ_0 . Conversely, if $\lambda \mapsto p_\lambda(k)$ is differentiable in a neighbourhood U_0 of λ_0 for all $k \geq 1$ and there exist $k_0 > 0$, $(h_k)_{k \geq k_0}$ and $v_0 : \mathbb{R}_+ \rightarrow \mathbb{R}_+$ such that, for all $k \geq k_0$ and $\lambda \in U_0$,

$$|\check{p}_{\lambda_0}(k) - \check{p}_\lambda(k)| \leq v_0(|\lambda - \lambda_0|)h_k, \quad (2.7)$$

with $v_0(r) \rightarrow 0$ as $r \downarrow 0$ and $\sum_{k>0} kh_k < \infty$, then (iv) is satisfied. The bound (2.7) holds for instance when $\lambda \mapsto p_\lambda(k)$ is twice differentiable on U_0 with $v_0(r) = r$ and h_k defined as a local bound of the second derivative $|\partial_\lambda^2 p_\lambda(k)|$, for instance

$$h_k = \sup_{\lambda \in U_0} |\partial_\lambda^2 p_\lambda(k)|.$$

Remark 2.5. In particular, in the Poisson case, $p_\lambda(k) = e^{-\lambda} \lambda^k / k!$, Conditions (ii)–(v) hold. Then Theorem 2.2 implies that the Hellinger differentiability of the pile-up model $\{g_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ at any (λ_0, θ_0) follows from that of the model $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ at θ_0 . Moreover, we have in the Poisson case

$$\check{M}_\lambda(u) = [1 + \lambda(u - 1)]e^{\lambda(u-1)} \quad \text{and} \quad \ddot{M}_\lambda(u) = \lambda^2 e^{\lambda(u-1)}, \quad u \in [0, 1]. \quad (2.8)$$

2.2 THE EFFECT OF PILE-UP ON INFORMATION BOUNDS

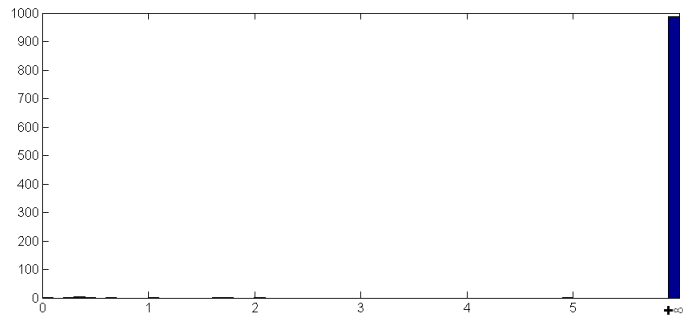
The motivation for studying information bounds in the pile-up model comes from a consideration of the fluorescence application. In the experimental set-up the average number of photons can be coarsely tuned by the user through the intensity of the laser that excites the molecules. Hence, the question about the best laser intensity arises.

The acquisition of fluorescence lifetime measurements is usually done at a very low laser intensity. Conventionally, the average number of detected fluorescence photons λ per laser pulse is lower than 0.05 (see e.g. Valeur, 2002). Then the probability that two or more photons strike the detector is negligible and only two events are likely: either no photon is detected or exactly one photon hits the detector. Thus, the recorded photon arrival times can be considered as i.i.d. realizations of the underlying exponential mixture distribution and classical estimators as least-squares methods (O'Connor & Phillips, 1984) or the maximum likelihood estimator (Hall & Selinger, 1981) can be applied to recover the exponential mixture parameters.

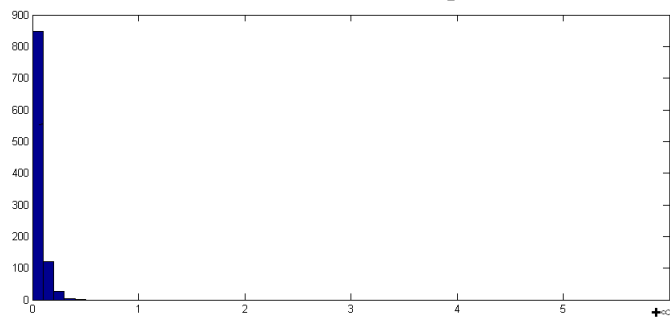
Working at a low intensity λ is inconvenient since the proportion of laser pulses where no photon is detected is very high. In fact, if $\lambda = 0.05$ this proportion is about 95%. It is clear that these events do not contain any information on the target distribution, which is the distribution of the photon arrival times. As an illustrating example Figure 2.1 a) shows a typical histogram with intensity $\lambda = 0.02$ and exponential target distribution with parameter $\theta = 1$. Only 13 photon arrival times are recorded out of 1,000 laser pulses. It is obvious that for a reliable estimation of θ a very large number of excitations is necessary. Thus, the acquisition time must be very long.

In the opposite extreme case, when the intensity λ is rather large, it is unlikely that a laser pulse is not followed by a photon event. However, the pile-up effect becomes overwhelming. Indeed, the larger the intensity λ , the closer is the pile-up distribution to a degenerated distribution with all mass at 0. See for an example Figure 2.1 b) that displays a histogram with intensity $\lambda = 20$. Here 847 observations out of 1,000 arrive in the first bin. Inference on the exponential parameter seems to be difficult.

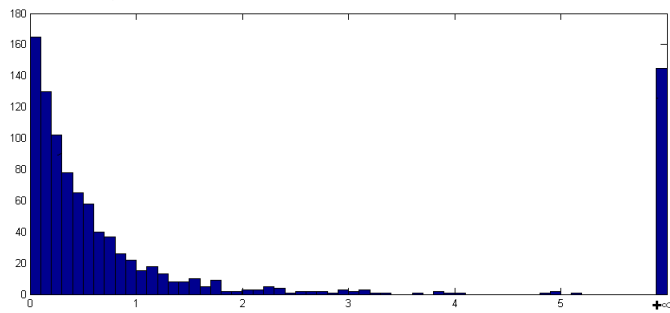
Intuitively, we may find that a trade-off between these two extreme situations is favorable. We may slightly increase the proportion of observations where photons are detected, while we take care that the pile-up effect does not become too important. Figure 2.1 c) displays a histogram with



a) $\lambda = 0.02$; 13 detected photons



b) $\lambda = 20$; 847 observations in the first bin



c) $\lambda = 2$

Figure 2.1: Histograms with different degrees of pile-up effect. All histograms are based on 1,000 observations with underlying exponential density with parameter $\theta = 1$ for different Poisson parameters λ .

intensity $\lambda = 2$. It looks like a usual histogram where the observations are quite dispersed and only a modest proportion of less than 15% of the observations contains no information on θ .

The following study of the information bounds for the pile-up model confirms our intuition. We will see that it is unfavorable to collect data at a very low intensity λ .

To assure the existence of the Fisher information defined in (1.13) we will make the following assumption.

Assumption 2.2. In addition to Assumption 2.1 suppose that for a given (λ_0, θ_0) the density families $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ and $\{p_\lambda, \lambda \in \Lambda\}$ satisfy Condition (i) and Conditions (ii)–(v) in Theorem 2.2, respectively. Moreover, we assume that Θ and Λ are open sets.

The implication of Theorem 2.2 is that the pile-up model $\{g_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ is Hellinger differentiable at (λ_0, θ_0) , with derivative $\dot{\zeta}_{\lambda_0, \theta_0}$ given by (2.3), (2.4) and (2.5). We denote the corresponding Fisher information matrix of the pile-up model by

$$I(\lambda_0, \theta_0) = 4 \int \dot{\zeta}_{\lambda_0, \theta_0} \dot{\zeta}_{\lambda_0, \theta_0}^T d\overline{\mathcal{L}}_+ = \begin{bmatrix} I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) & I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0) \\ I_{\lambda, \theta}^T(\lambda_0, \theta_0) & I_\theta(\lambda_0, \theta_0) \end{bmatrix}, \quad (2.9)$$

where, in the given block description, $I_\lambda(\lambda_0, \theta_0)$ is defined as a scalar, $I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0)$ as a row vector of length d and $I_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ as a $d \times d$ matrix. If $I(\lambda_0, \theta_0)$ is nonsingular, its inverse, which appears in the information bound (1.14), is denoted by

$$CR(\lambda_0, \theta_0) = I^{-1}(\lambda_0, \theta_0) = \begin{bmatrix} CR_\lambda(\lambda_0, \theta_0) & CR_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0) \\ CR_{\lambda, \theta}^T(\lambda_0, \theta_0) & CR_\theta(\lambda_0, \theta_0) \end{bmatrix}, \quad (2.10)$$

with a similar block description as above, that is, $CR_\lambda(\lambda_0, \theta_0)$ is a scalar, $CR_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0)$ is a row vector of length d and $CR_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ is a $d \times d$ matrix. Hence, $CR(\lambda_0, \theta_0)$ is a lower bound for the variance of unbiased estimators of (λ_0, θ_0) , see Theorem 1.4.

2.2.1 FISHER INFORMATION OF λ

As a first general property of the pile-up model $\{g_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ we observe that for every density families $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ and $\{p_\lambda, \lambda \in \Lambda\}$ the Fisher information of λ is independent from the target distribution F_{θ_0} .

Theorem 2.6. *Under Assumption 2.2 the Fisher information term $I_\lambda(\lambda_0, \theta_0)$ of the pile-up model $\{g_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ defined by (2.9) is independent of θ_0 and $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$. More precisely,*

$$I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) = \int_0^1 \frac{\check{M}_{\lambda_0}^2(u)}{\check{M}_{\lambda_0}(u)} du + \frac{\check{p}_{\lambda_0}^2(0)}{p_{\lambda_0}(0)}. \quad (2.11)$$

It may appear surprising that I_λ does not depend on the target distribution f_{θ_0} , because this means that there is no distribution f_θ that under the pile-up effect reveals more information on λ than another target distribution. We will see below that the converse is not true. On the contrary, the information of θ depends heavily on p_λ .

Note that the proportion of observations that equal infinity, $\hat{p}_0 = \#\{i : Z_i = \infty\}/n$, is also independent from the target distribution. This proportion is a natural unbiased estimator of the

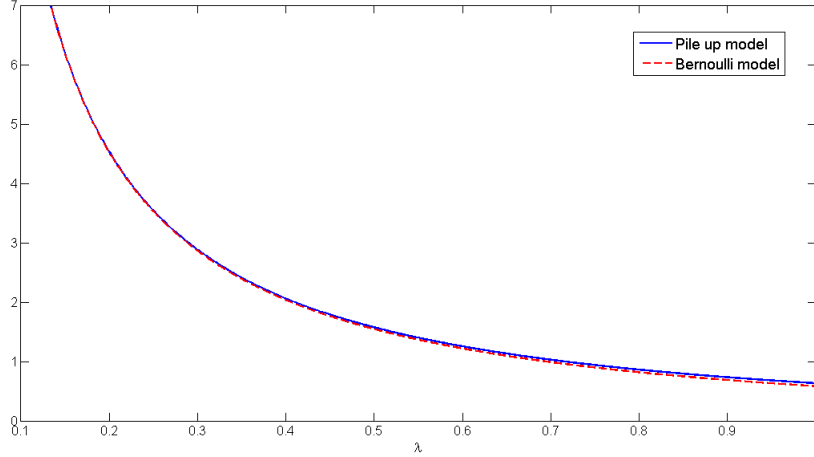


Figure 2.2: Fisher information $\lambda \mapsto I_\lambda(\theta_0, \lambda)$ of λ for the pile-up model in the Poisson case versus the Fisher information of the Bernoulli model with parameter $e^{-\lambda}$.

probability $p_\lambda(0)$ of detecting no photons. Hence, \hat{p}_0 can be used to estimate λ if $p_\lambda(0) \neq p_{\lambda'}(0)$ for all $\lambda \neq \lambda'$.

Let us consider the Poisson case as an example. Inverting the equation $\hat{p}_0 = p_\lambda(0)$ gives the estimator

$$\hat{\lambda} = -\log \hat{p}_0 .$$

The fact that we only use the proportion of observations equal infinity to estimate λ suggests to compare the Fisher information I_λ of the pile-up model with the one of the Bernoulli model obtained by projecting the pile-up observations on the pair $\{0, 1\}$. Using the functions \tilde{M} and \dot{M} that, in the Poisson case, are given by (1.6) and (2.8), the Fisher information I_λ of λ turns out to be

$$I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) = \frac{1}{\lambda_0} \int_0^1 [1 + \lambda_0(u - 1)] e^{\lambda_0(u-1)} du + e^{-\lambda_0} = \frac{1 - e^{-\lambda_0}}{\lambda_0^2} . \quad (2.12)$$

Furthermore, the Fisher information of λ of a Bernoulli model with Bernoulli parameter $p = p_\lambda(0) = e^{-\lambda}$ is given by $\tilde{I}_\lambda = (e^\lambda - 1)^{-1}$. A plot of both Fisher informations I_λ and \tilde{I}_λ shows that for values of $\lambda \leq 1$ the two information functions virtually coincide, see Figure 2.2. This means that in this range ($\lambda \leq 1$) in the pile-up model all the information on the Poisson parameter λ is contained in the proportion of observations equal infinity. Furthermore, observe that the Fisher information I_λ of the pile-up model slightly exceeds the information \tilde{I}_λ of the Bernoulli model, for all λ . This is clear because the Bernoulli model is obtained by projection.

2.2.2 ASYMPTOTIC BEHAVIOR FOR SMALL λ IN THE POISSON CASE

Our main motivation is to investigate whether, from an information point of view, it is legitimate to collect fluorescence-lifetime data at a very low intensity λ_0 . Notably, the question is whether the currently used low intensity is optimal.

For the case where N has Poisson distribution with parameter $\lambda_0 > 0$ we now provide an

approximation of the information bound $CR_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ of the parameter θ_0 while λ_0 tends to 0. We will see that the Cramér-Rao bound $\lambda_0 \mapsto CR_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ behaves as λ_0^{-1} . Thus, the information on θ in the pile-up model diminishes rapidly when λ_0 tends to 0.

If the Poisson parameter λ_0 is sufficiently small the probability of detecting two or more photons becomes negligible and the model is similar to the distribution where the value ∞ is observed with probability $e^{-\lambda_0}$ and otherwise a random variable Y with density f_{θ_0} . Formally, we define the following random variable

$$X = \begin{cases} Y & \text{with probability } 1 - e^{-\lambda_0} \\ \infty & \text{with probability } e^{-\lambda_0} . \end{cases} \quad (2.13)$$

Hence, for small λ_0 , the density of X is a good approximation of the pile-up density g_{λ_0, θ_0} . This model has the advantage that the corresponding information matrix is easier to calculate and to inverse. Using this approximation one can prove the following result.

Theorem 2.7. *Let p_λ be the Poisson distribution $Poi(\lambda)$. Suppose that $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ is Hellinger differentiable at θ_0 . Denote by $I(\lambda_0, \theta_0)$ the Fisher information of the pile-up model, and by $I^f(\theta_0)$ the Fisher information associated with the original model $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$. Assume that $I^f(\theta_0)$ is nonsingular. Then for every λ_0 small enough, $I(\lambda_0, \theta_0)$ is nonsingular and the Cramér-Rao bound CR given by (2.10) satisfies the following asymptotic equivalences, as $\lambda_0 \rightarrow 0$,*

$$CR_\lambda(\lambda_0, \theta_0) \sim \lambda_0, \quad \text{and} \quad CR_\theta(\lambda_0, \theta_0) \sim \frac{(I^f)^{-1}(\theta_0)}{\lambda_0} .$$

The theorem asserts that the information bound $CR_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ increases greatly when λ_0 decreases. Thus, the usual choice of a microscopic λ_0 in fluorescence experiments results in a significant loss of information on the parameter of interest θ_0 and deteriorates the estimation quality. A very large number of observations is necessary to reduce the variance of the parameter estimate. This entails a long acquisition time, which is not only costly, but in addition instabilities of the electronic components of the measuring instrument may occur. For instance, the laser intensity can change and hence, not all observations are recorded at the same Poisson parameter λ_0 . To circumvent the difficulty of including those phenomenons in an estimation procedure, it is preferable to avoid them.

2.2.3 SCALE FAMILY

A case of special interest is when the family of target densities $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ is a *scale family* $\{\theta f_1(\theta \cdot), \theta > 0\}$ with $d = 1$. Note that the exponential densities form a scale family. From the specific structure of the scale family it follows that the Cramér-Rao bound $\lambda \mapsto CR_\theta(\lambda, \theta_0)$ achieves a minimum at a point λ_{opt} which is the same for all $\theta_0 > 0$.

Due to the multiplicative character of the scale family, we have the property that a scale family is Hellinger differentiable for all $\theta_0 > 0$ if the scale family is known to be Hellinger differentiable at a single point.

Lemma 2.8. *Let $\{f_\theta, \theta > 0\}$ be a scale family. Then, for any $\theta_0 > 0$, $\{f_\theta, \theta > 0\}$ is Hellinger differentiable at $\theta = \theta_0$ if and only if $\{f_\theta, \theta > 0\}$ is Hellinger differentiable at $\theta = 1$. And the Hellinger derivative satisfies*

$$\dot{\xi}_{\theta_0}(x) = \frac{1}{\sqrt{\theta_0}} \dot{\xi}_1(\theta_0 x) .$$

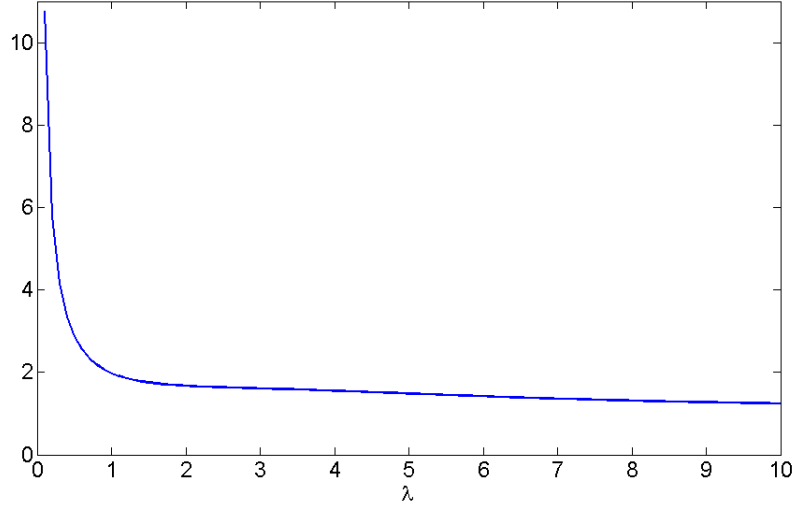


Figure 2.3: Cramér-Rao bound of θ with known λ_0 for the pile-up model with exponential target distribution in the Poisson case.

As θ is a scale parameter in the pile-up model, its Hellinger derivative satisfies the same multiplicative relation as $\dot{\xi}_\theta$, that is $\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(z) = \frac{1}{\sqrt{\theta_0}} \partial_\theta \zeta_{\lambda_0, 1}(\theta_0 z)$. This entails that the Cramér-Rao bound satisfies a multiplicative relation and consequently that the point of minimum λ_{opt} of the Cramér-Rao bound $\lambda_0 \mapsto CR_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ is the same for every θ_0 .

Theorem 2.9. *Let $\{f_\theta, \theta > 0\}$ be a scale family. If Assumption 2.2 holds for some $(\tilde{\lambda}, \tilde{\theta})$ and the Fisher information matrix $I(\tilde{\lambda}, \tilde{\theta})$ is nonsingular, then Assumption 2.2 and the invertibility of $I(\lambda_0, \theta_0)$ hold for any positive value of θ_0 and the Cramér-Rao bound is given by*

$$CR(\lambda_0, \theta_0) = \begin{bmatrix} CR_\lambda(\lambda_0, 1) & \theta_0 CR_{\lambda, \theta}(\lambda_0, 1) \\ \theta_0 CR_{\lambda, \theta}^T(\lambda_0, 1) & \theta_0^2 CR_\theta(\lambda_0, 1) \end{bmatrix}. \quad (2.14)$$

Consequently, $\arg \min_{\lambda_0} CR_\theta(\lambda_0, \theta_0) = \arg \min_{\lambda_0} CR_\theta(\lambda_0, 1)$, and thus the value of λ_0 minimizing the Cramér-Rao bound $CR_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ does not depend on θ_0 .

2.2.4 EXPONENTIAL CASE

In view of the fluorescence application, we pay special attention to the exponential case where f_{θ_0} belongs to the family of exponential distributions $\{f_\theta(x) = \theta e^{-\theta x}, \theta > 0\}$. Furthermore, let us assume that p_λ is the Poisson distribution. In this case the Fisher information of the pile-up model can be computed explicitly. As a result, we observe that, if λ_0 is known, the Cramér-Rao bound of θ_0 associated with the pile-up model is strictly decreasing as λ_0 increases. Moreover, the Cramér-Rao bound of the pile-up model tends to the Cramér-Rao bound of the simple exponential model.

If both parameters λ_0 and θ_0 are unknown, it is relatively easy to determine the optimal value of λ_0 that minimizes the Cramér-Rao bound term CR_θ by numerical minimization, since $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ is a Hellinger differentiable scale family. In view of Theorem 2.9, our study of the pile-up model

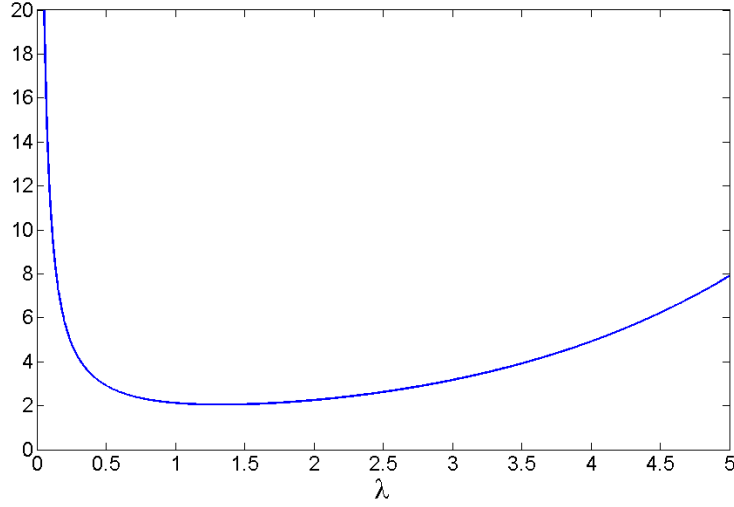


Figure 2.4: Cramér-Rao bound $\lambda \mapsto CR_\theta(\lambda, 1)$ of θ for the pile-up model with exponential target distribution in the Poisson case. The minimum is attained at $\lambda_{\text{opt}} \approx 1.3275$.

can be restricted to the case of $\theta_0 = 1$ and for every θ_0 the Cramér-Rao bound CR_θ achieves its minimum at one and the same point λ_{opt} .

The computation of the Fisher information as defined by (2.9) yields the following explicit form

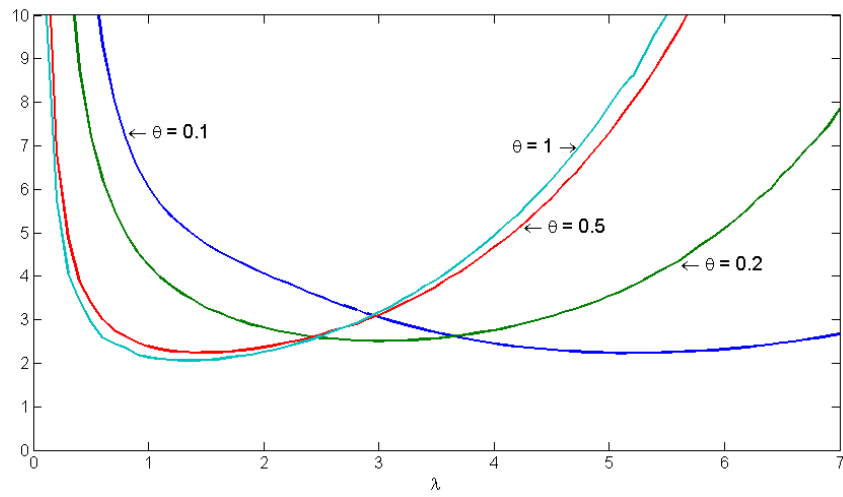
$$\begin{aligned}
 I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) &= \frac{1 - e^{-\lambda_0}}{\lambda_0^2}, \\
 I_\theta(\lambda_0, \theta_0) &= \theta_0^{-2} \left[1 - e^{-\lambda_0} + \right. \\
 &\quad \left. \lambda_0 e^{-\lambda_0} \{ b_{\lambda_0}(2, 1) + \lambda_0^2 b_{\lambda_0}(2, 3) - 2b_{\lambda_0}(1, 1) - 2\lambda_0 b_{\lambda_0}(1, 2) + 2\lambda_0 b_{\lambda_0}(2, 2) \} \right], \\
 I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0) &= \theta_0^{-1} \left[\lambda_0^{-1} - 1 + e^{-\lambda_0} \{ 1 - \lambda_0^{-1} + (\lambda_0 - 1)b_{\lambda_0}(1, 1) + \right. \\
 &\quad \left. \lambda_0 b_{\lambda_0}(0, 2) + (\lambda_0^2 - 2\lambda_0)b_{\lambda_0}(1, 2) - \lambda_0^2 b_{\lambda_0}(1, 3) \} \right],
 \end{aligned} \tag{2.15}$$

where

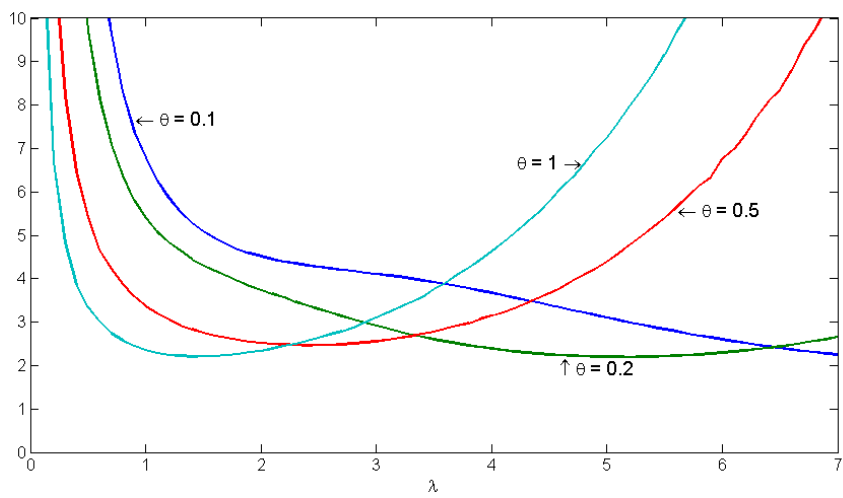
$$b_\lambda(m, n) = \int_0^\infty z^m e^{-nz + \lambda e^{-z}} dz = \sum_{k=0}^\infty \frac{\lambda^k}{k!} \int_0^\infty z^m e^{-z(n+k)} dz = m! \sum_{k=0}^\infty \frac{\lambda^k}{k!(k+n)^{m+1}}. \tag{2.16}$$

The following theorem describes the asymptotic behaviour of the Fisher information I_θ when λ tends to infinity. We state that the pile-up model with large λ contains (asymptotically) the same amount of information on the exponential parameter θ as a random variable with exponential distribution.

Theorem 2.10. *Let $\{f_\theta(x) = \theta e^{-\theta x}, \theta > 0\}$ be the family of exponential densities and let p_λ be the Poisson distribution $\text{Poi}(\lambda)$. Then the Fisher information of the parameter θ associated with*



a) $T = 10$



b) $T = 5$

Figure 2.5: Cramér-Rao bound of θ with known λ and censoring at T in the exponential case.

the pile-up model satisfies, for all $\theta_0 > 0$,

$$\lim_{\lambda_0 \rightarrow \infty} I_\theta(\lambda_0, \theta_0) = \frac{1}{\theta_0^2}. \quad (2.17)$$

If λ_0 is known, then the Cramér-Rao bound of θ_0 associated with the pile-up model is given by the inverse of $I_\theta(\lambda_0, \theta_0)$, displayed in Figure 2.3. As the Cramér-Rao bound is strictly decreasing, it seems to be favorable to choose λ_0 as large as possible. However, in an experimental set-up where the resolution of the observed values is always finite this is not recommended, because the larger λ_0 , the more the pile-up distribution is compressed to the origin. Hence, to capture all information an indefinitely high resolution is necessary. Otherwise, the observations become indistinguishable as in Figure 2.1 b), where most of the observations fall in the first histogram bin, and inference on the exponential parameter becomes infeasible.

Let us now consider the case where both parameters λ_0 and θ_0 are unknown. The Cramér-Rao bound $CR_\theta(\lambda_0, \theta_0)$ on θ_0 writes

$$CR_\theta(\lambda_0, \theta_0) = \frac{I_\lambda(\lambda_0, \theta_0)}{I_\lambda(\lambda_0, \theta_0)I_\theta(\lambda_0, \theta_0) - (I_{\lambda,\theta}(\lambda_0, \theta_0))^2},$$

where I_λ , I_θ and $I_{\lambda,\theta}$ are given by (2.15). From Figure 2.4 we see that the Cramér-Rao bound $\lambda \mapsto CR_\theta(\lambda, 1)$ of $\theta_0 = 1$ is convex in λ . A numerical minimization yields a minimum at $\lambda_{\text{opt}} \approx 1.3275$. Furthermore, Theorem 2.9 implies that λ_{opt} minimizes the Cramér-Rao bound $\lambda \mapsto CR_\theta(\lambda, \theta_0)$ uniformly for all $\theta_0 > 0$. This result suggests to carry out fluorescence lifetime measurements at this optimal intensity λ_{opt} provided that the target density f_{θ_0} is the exponential density. The value of λ_{opt} is much larger than the intensity usually used in fluorescence measurements ($\lambda < 0.05$). The difference of the values of the Cramér-Rao bound at λ_{opt} and for small $\lambda < 0.05$ indicates that the gain of information is significant. We conclude that it is worthwhile to increase the intensity λ because this opens the way for estimators with much smaller variance. In Section 2.3 we propose such an efficient estimator for the pile-up model.

As mentioned in Section 1.2 in an experimental set-up a finite observation time $T < \infty$ is used. That is pile-up observations are right-censored and distributed as a random variable defined by (1.12). Censoring the observations has the unpleasant effect, that for target distributions belonging to a scale family no optimal value λ_{opt} exists that minimizes the Cramér-Rao bound uniformly for all θ . The optimal intensity now depends on θ .

Simulations for the family of exponential densities show that the larger the probability of censored observations, the larger is the optimal value of the Poisson parameter. See Figure 2.5 a) and b) for illustration, where the Cramér-Rao bound $\lambda \mapsto CR_\theta(\lambda, \theta)$ is displayed for four different values of θ and for two different values of T . To obtain graphs of the same magnitude, the values of all the Cramér-Rao bounds are divided by θ^2 . We observe that if T is large with respect to the tail of the exponential density, the minimum of the Cramér-Rao bound is nearly unchanged and achieved at $\lambda \approx 1.32$, which is the case for $\theta = 1$ and $\theta = 0.5$ if $T = 10$ and for $\theta = 1$ if $T = 5$. This phenomenon suggests that if the maximal observation time T is relatively short with respect to the tail of the target distribution, then it is preferable to increase the average number of detected photons such that the observed minimum falls within the interval $(0, T)$ with high probability.

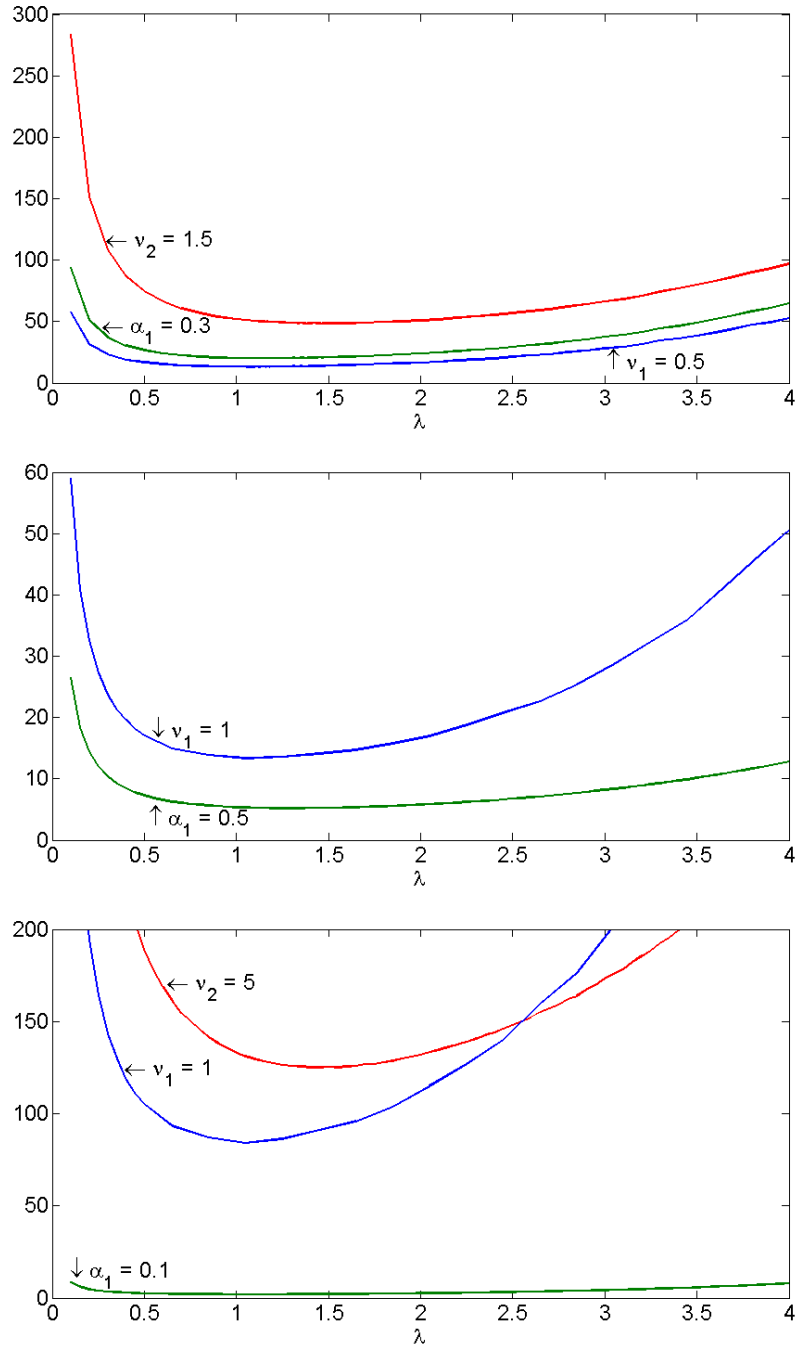


Figure 2.6: Cramér-Rao bounds $\lambda \mapsto CR(\lambda, \theta_0)$ for two-component models with unknown λ . In the second graph the Cramér-Rao bound $\lambda \mapsto CR(\lambda, \nu_2 = 5)$ is missing since it largely exceeds the others; it achieves its minimum at $\lambda = 1.8$ where the Cramér-Rao bound equals 463.8 .

2.2.5 MULTI-EXPONENTIAL CASE

There are experiments with more than one fluorescent molecule. Then the target distribution F_θ is the mixture of exponential distributions with multi-exponential density f_θ defined in (1.10). Note that the collection of multi-exponential densities

$$\left\{ f_\theta(y) = \sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k y}, \theta \in \Theta \right\}$$

with $\alpha_K = 1 - \sum_{k=1}^{K-1} \alpha_k$ and

$$\Theta = \left\{ \theta = (\alpha_1, \dots, \alpha_{K-1}, \nu_1, \dots, \nu_K) : \sum_{k=1}^{K-1} \alpha_k < 1, \alpha_k > 0 \text{ and } \nu_k > 0 \text{ for all } k = 1, \dots, K \right\}$$

is Hellinger differentiable on Θ . However, mixtures with two components or more ($K \geq 2$) do not form a scale family. Consequently, Theorem 2.9 concerning the existence of a uniformly optimal value λ_{opt} that minimizes the Cramér-Rao bound does not apply.

For a two-component mixture, Figure 2.6 shows the graphs of the Cramér-Rao bounds of the associated pile-up model for different choices of parameters θ_0 in the Poisson case. All graphs are obtained by inverting an approximation of the Fisher information matrix obtained by Monte Carlo simulation. Although all functions are convex in λ , note that no unique optimal value λ_{opt} exists that minimizes all Cramér-Rao bounds simultaneously. The minimum values depend on θ_0 . Nevertheless, the graphs suggest that choosing λ within the interval $[1, 2]$ for a two-component model is favorable. Especially in comparison to the Cramér-Rao bound for small λ , there is a significant increase of information.

2.3 GIBBS SAMPLER FOR THE MULTI-EXPONENTIAL PILE-UP MODEL

The goal of this section is to construct a parameter estimate that takes advantage of the preceding results on the information bounds. That is, we search an estimator that is adapted to the pile-up effect. In view of the fluorescence application, we focus on the single- and multi-exponential case where N has Poisson distribution. Note that exponential mixtures are of general interest for survival or duration setups. We construct a Gibbs sampler and assess its performance by a simulation study. It is shown that this estimator achieves the Cramér-Rao bound for every intensity $\lambda > 0$. In particular, we observe that the variance of the estimator applied on data obtained at an elevated intensity is much smaller than the variance of the estimator when it is applied on data with small intensity. Furthermore, a tool to control the convergence of the algorithm is provided, which is based on Rao-Balckwellized Riemann control variates.

Due to the involved form of the pile-up density, standard estimation procedures as the maximum likelihood estimator or moment estimators are intractable. Let us rewriting the pile-up distribution of some observation Z defined in (1.2) with multi-exponential target distribution given by (1.10) and Poisson group-size distribution as follows

$$G(z) = 1 - \mathbb{P}(Z > z) = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} p_\lambda(n) n! \sum_{(m_1, \dots, m_K) : \sum_j m_j = n} \frac{\prod_{j=1}^K \alpha_j^{m_j}}{\prod_{j=1}^K m_j!} e^{-z \sum_{j=1}^K m_j \nu_j} .$$

It follows that Z has an infinite exponential mixture distribution where the set of exponential parameters is given by $\nu_1\mathbb{N} + \nu_2\mathbb{N} + \dots + \nu_K\mathbb{N}$ and the weights have the form

$$\frac{p_\lambda \left(\sum_{j=1}^K m_j \right) \left(\sum_{j=1}^K m_j \right)! \prod_{j=1}^K \alpha_j^{m_j}}{\prod_{j=1}^K m_j!}, \quad \text{for } m_j \in \mathbb{N}, j = 1, \dots, K.$$

Existing methods for estimating the mixing distribution of a finite or infinite exponential mixture are the classical EM algorithm (Dempster *et al.*, 1977) as proposed in Jewell (1982), the penalized dual method Pilla *et al.* (2006) or the alternative EM algorithm Pilla & Lindsay (2001) both searching the nonparametric maximum likelihood estimator (NPMLE). Another approach is a Markov Chain Monte-Carlo (MCMC) method proposed in Gruet *et al.* (1999). In our context the EM algorithm is hard to handle since the maximization step does not provide explicit solutions for all parameters. The NPMLE methods seem to be irrelevant unless one takes into account the specific structure of the parameter set and the weights. The MCMC approach, by contrast, is easily adapted to the pile-up density, although, due to the more involved structure of the model, the data augmentation scheme in Gruet *et al.* (1999) cannot be applied. Instead, we propose to use a more complex missing data vector in order to obtain simple posterior distributions.

2.3.1 GIBBS SAMPLING ALGORITHM

We present a Gibbs sampling algorithm to estimate the parameters of the pile-up model in the multi-exponential case.

As mentioned in Section 1.2, a more realistic model than (1.2) is based on right-censored data as defined by (1.12). That is, we consider the pile-up model where photons arriving after some finite time T will be censored. In practice T may be chosen large enough such that the probability of photons arriving after T is negligible. The pile-up distribution function G of a right-censored pile-up observation Z as defined by (1.12) is given by

$$G(z) = 1 - e^{-\lambda F_\theta(z)}, \quad z \in [0, T].$$

Thus, Z has a density g with respect to the measure $\mathcal{L}_{(0,T)} \otimes \delta_T$ where $\mathcal{L}_{(0,T)}$ denotes the Lebesgue measure on $(0, T)$ and δ_T the measure having mass one in T . The pile-up density is given by

$$g(z) = \begin{cases} \lambda f_\theta(z) e^{-\lambda F_\theta(z)} & \text{if } z \in (0, T) \\ e^{-\lambda F_\theta(T)} & \text{if } z = T. \end{cases}$$

As mixtures are ill-posed problems, proper priors are not recommended, even not when they have large variances. The problem is that the influence of a particular proper prior cannot be truly assessed. Another difficulty occurring with mixture distributions is the label switching problem. For more details on these issues see for example Marin *et al.* (2005) or Marin & Robert (2007). A reparametrization can resolve both problems. More precisely, we introduce dependence between the mixture components by a new parametrization of the model. First, identifiability of the model is obtained by ordering the exponential parameters

$$\nu_1 > \nu_2 > \dots > \nu_K,$$

then, as in Gruet *et al.* (1999), we reparametrize the exponential parameters as follows

$$\phi = \nu_1, \quad \tau_k = \frac{\nu_k}{\nu_{k-1}} \quad \text{for } k = 2, \dots, K,$$

with $\phi > 0$ and $\tau_k \in [0, 1]$.

As the Gibbs sampling algorithm generates new parameter values one by one conditional to the other parameter values another problem concerning the weights α_k occurs. Since the weights α_k are confined to the interval $(0, 1)$ and satisfy the constraint $\sum_{k=1}^K \alpha_k = 1$, the set of possible values of $(\alpha_1, \dots, \alpha_K)$ at one step of the algorithm is not the entire set $\{(\alpha_1, \dots, \alpha_K) \in [0, 1]^K : \sum_{k=1}^K \alpha_k = 1\}$. Even if we use for sparsity only the weights $\alpha_1, \dots, \alpha_{K-1}$, the conditional distribution of α_1 given the other weights has support on $(0, 1 - \sum_{k=2}^{K-1} \alpha_k)$ and not $(0, 1)$. To elude that problem we propose the following reparametrization

$$q_k = \frac{\alpha_k}{1 - \sum_{j=1}^{k-1} \alpha_j} \quad \text{for } k = 1, \dots, K-1,$$

with $q_k \in [0, 1]$. Denote the new parameter vector by $\xi = (\lambda, q_1, \dots, q_{K-1}, \phi, \tau_2, \dots, \tau_K)^T$ and by Ξ the corresponding parameter set. One can show as in Gruet *et al.* (1999) that the following noninformative prior that leads to proper posterior distributions

$$\pi(\xi) = \frac{1}{\lambda \phi} \prod_{k=1}^{K-1} \mathbb{1}\{q_k \in [0, 1]\} \prod_{k=2}^K \mathbb{1}\{\tau_k \in [0, 1]\}.$$

The Gibbs sampling algorithm consists of iterating the following two steps: (a) data augmentation and (b) generation of new parameter values drawn from the posterior distributions, see Subsection 1.5.2. The point of adding missing variables in the data augmentation step is to obtain simple posterior distributions for step (b) such that the generation of parameter values can be done without much effort. In general, when dealing with mixture distributions, the missing variable is the label of the mixture component that has generated the observation. In the pile-up model this is not a convenient choice, since it does not lead to nice posterior distributions. Therefore, we propose a different data augmentation scheme. Notice that in the pile-up model there is more missing information than in a simple mixture model. The number of photons over which the minimum is taken is unknown and we are unaware of the distribution of each photon. Therefore, we propose to define for each observation Z the vector (B_1, \dots, B_K) of missing variables where each B_k is the number of photons generated from the k -th mixture component. Thus, the sum $\sum_k B_k$ represents the number of photons per laser pulse. We will see that this choice of latent variables leads to standard posterior distributions.

The missing data vector (B_1, \dots, B_K) of a pile-up observation Z is generated in two steps. Let X_z be a random variable that has Poisson distribution with parameter $\lambda(1 - F_\theta(z))$. First draw the total number of photons N from the distribution

$$N|Z, \xi \stackrel{d}{=} \begin{cases} X_Z + 1 & \text{if } Z \in (0, T) \\ X_T & \text{if } Z = T, \end{cases} \quad (2.18)$$

then draw a vector (B_1, \dots, B_K) from the distribution given by the following probabilities

$$\mathbb{P}(B_1 = b_1, \dots, B_K = b_K | N = n, Z, \xi) \quad (2.19)$$

$$= \begin{cases} \frac{(n-1)! \prod_k \alpha_k^{b_k} \sum_k b_k \nu_k}{f(Z)(1-F(Z))^{n-1} \prod_k b_k!} e^{-Z \sum_k b_k \nu_k} & \text{for } n \geq 1 \text{ if } Z \in (0, T) \\ \frac{n! \prod_k \alpha_k^{b_k}}{(1-F(T))^n \prod_k b_k!} e^{-T \sum_k b_k \nu_k} & \text{for } n \geq 0 \text{ if } Z = T, \end{cases}$$

provided that $b_k \in \{0, \dots, n\}$ and $\sum_k b_k = n$. To sample from this distribution, one first computes the probabilities of all possible outcomes, that is the probability of each vector (b_1, \dots, b_K)

such that $\sum_k b_k = n$. Note that the number of possible outcomes is finite. Then one draws a variable from the uniform distribution $U(0, 1)$ to simulate from this discrete distribution.

We introduce the notation $\xi^{(-\lambda)}$ for the vector ξ where the element λ is missing. The notations $\xi^{(-\phi)}$, $\xi^{(-\tau_l)}$ and $\xi^{(-q)}$ are defined likewise. Further, put $\tau_1 = 1$ and $q_K = 1$ and denote by $\mathbf{Z} = (Z_1, \dots, Z_M)$ the data vector and by $\mathbf{B} = (B_{ik})_{i=1, \dots, M, k=1, \dots, K}$ the missing data matrix. Writing

$$\begin{aligned} p(\xi_l | \mathbf{Z}, \mathbf{B}, \xi^{(-l)}) &\propto p(\mathbf{Z} | \mathbf{B}, \xi) p(\mathbf{B} | \xi) \pi(\xi) \\ &\propto \prod_{i: Z_i < T} \left(\left(\phi \sum_{k=1}^K \tau_1 \dots \tau_k B_{ik} \right) e^{-Z_i \phi \sum_k \tau_1 \dots \tau_k B_{ik}} \right) \prod_{i: Z_i = T} e^{-T \phi \sum_k \tau_1 \dots \tau_k B_{ik}} \\ &\quad \times \prod_{i=1}^M \left(e^{-\lambda \sum_k B_{ik}} \prod_{k=1}^K ((1 - q_1) \dots (1 - q_k - 1) q_k)^{B_{ik}} \right) \times \frac{1}{\lambda \phi}, \end{aligned}$$

we can see that the posterior distributions for the different parameters given the data \mathbf{Z} , the missing data \mathbf{B} and the other parameters turn out to be

$$\begin{aligned} \lambda | (\mathbf{Z}, \mathbf{B}, \xi^{(-\lambda)}) &\sim \Gamma \left(\sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^K B_{ik}, M \right) \\ \phi | (\mathbf{Z}, \mathbf{B}, \xi^{(-\phi)}) &\sim \Gamma \left(\sum_{i=1}^M \mathbb{1} \left\{ \sum_{k=1}^K B_{ik} > 0 \right\}, \sum_{k=1}^K \tau_1 \dots \tau_k \sum_{i=1}^M B_{ik} Z_i \right) \\ q_l | (\mathbf{Z}, \mathbf{B}, \xi^{(-q_l)}) &\sim \text{Beta} \left(\sum_{i=1}^M B_{il} + 1, \sum_{i=1}^M \sum_{k=l+1}^K B_{ik} + 1 \right), \quad l = 1, \dots, K - 1. \end{aligned}$$

The posterior distribution of τ_l is a mixture of Gamma distributions restricted to the interval $[0, 1]$ with $\sum_{i=1}^M \mathbb{1} \{ \sum_{k=1}^K B_{ik} > 0 \}$ components. Since the computation of all parameters of this distribution is time-consuming, it is more convenient to use a slice sampler or the accept-reject method (Devroye, 1986) for simulation from the distribution where the density function is given by

$$\begin{aligned} p(\tau_l | \mathbf{Z}, \mathbf{B}, \xi^{(-\tau_l)}) \\ \propto \exp \left\{ -\phi \sum_{k=1}^K \tau_1 \dots \tau_k \sum_{i=1}^M B_{ik} Z_i \right\} \prod_{i: \sum_{k=1}^K B_{ik} > 0} \left(\phi \sum_{k=1}^K \tau_1 \dots \tau_k B_{ik} \right) \mathbb{1}_{[0,1]}(\tau_l), \quad l = 2, \dots, K. \end{aligned}$$

Parameter estimators are obtained by taking the mean of the generated values after discarding the parameters generated during the burn-in period. The algorithm is robust to different starting values. We recommend to use uniformly distributed values for the weights α_k and any distinct values for the exponential parameters ν_k . For the intensity λ the initial value

$$\log \left(\frac{M}{\sum_{i=1}^M \mathbb{1} \{ Z_i = T \}} \right),$$

may be used if T is rather large. In Subsection 2.2.1 we have mentioned that this is a natural estimator of the Poisson parameter in the pile-up model (1.2) with $T = \infty$, because $p_\lambda(0) = e^{-\lambda}$.

Remark that the order of sampling the parameters $\lambda^{[t]}$, $\phi^{[t]}$, $q_l^{[t]}$ and $\tau_l^{[t]}$ in step 2 in the following algorithm is arbitrary and may be modified.

Gibbs Sampling Algorithm

1. **Initialization.** Choose the initial value $\xi^{[0]} \in \Xi$.
2. **Step t .** For $t = 1, \dots$ until convergence do
 - a) **Data augmentation step.** For each $i = 1, \dots, M$ and $k = 1, \dots, K$ generate $n_i^{[t]}$ and $b_{i,k}^{[t]}$ from

$$n_i^{[t]} \sim N|(Z_i, \xi^{[t-1]}) \quad \text{and}$$

$$(b_{i,1}^{[t]}, \dots, b_{i,K}^{[t]}) \sim (B_1, \dots, B_K)|(N = n_i^{[t]}, Z_i, \xi^{[t-1]})$$

with conditional distributions given in (2.18) and (2.19), respectively, with parameter vector $\xi^{[t-1]} = (\lambda^{[t-1]}, \phi^{[t-1]}, \tau_2^{[t-1]}, \dots, \tau_K^{[t-1]}, q_1^{[t-1]}, \dots, q_{K-1}^{[t-1]})$.

- b) **Generation of parameter values.** Generate $\lambda^{[t]}, \phi^{[t]}$ and $q_l^{[t]}$ for $l = 1, \dots, K - 1$ from

$$\lambda^{[t]} \sim \Gamma \left(\sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^K b_{ik}^{[t-1]}, M \right),$$

$$\phi^{[t]} \sim \Gamma \left(\sum_{i=1}^M \mathbb{1} \left\{ \sum_{k=1}^K b_{ik}^{[t]} > 0 \right\}, \sum_{k=1}^K \tau_1^{[t-1]} \dots \tau_k^{[t-1]} \sum_{i=1}^M b_{ik}^{[t]} Z_i \right),$$

$$q_l^{[t]} \sim \text{Beta} \left(\sum_{i=1}^M b_{il}^{[t]} + 1, \sum_{i=1}^M \sum_{k=l+1}^K b_{ik}^{[t]} + 1 \right).$$

By the accept-reject method, generate $\tau_l^{[t]}$ for $l = 2, \dots, K$ from

$$\tau_l^{[t]} \propto \exp \left\{ -\phi^{[t]} \sum_{k=1}^K \tau_1^{[t]} \dots \tau_{l-1}^{[t]} \tau_l \tau_{l+1}^{[t-1]} \dots \tau_k^{[t-1]} \sum_{i=1}^M b_{ik}^{[t]} Z_i \right\}$$

$$\times \prod_{i: \sum_{k=1}^K b_{ik}^{[t]} > 0} \left(\phi^{[t]} \sum_{k=1}^K \tau_1^{[t]} \dots \tau_{l-1}^{[t]} \tau_l \tau_{l+1}^{[t-1]} \dots \tau_k^{[t-1]} b_{ik}^{[t]} \right) \mathbb{1}_{[0,1]}(\tau_l).$$

2.3.2 CONVERGENCE CONTROL TOOL

As in every MCMC application, the problem of controlling convergence and devising satisfactory stopping rules is a major issue. A first insight into convergence is gained by the evolution of the parameter means, see Figure 2.7. Note that an overall stability in the approximation of the parameter estimates is attained, though there are parameters that get stable more quickly than others.

Nevertheless, the stability of the parameter estimates is not sufficient to assess the convergence

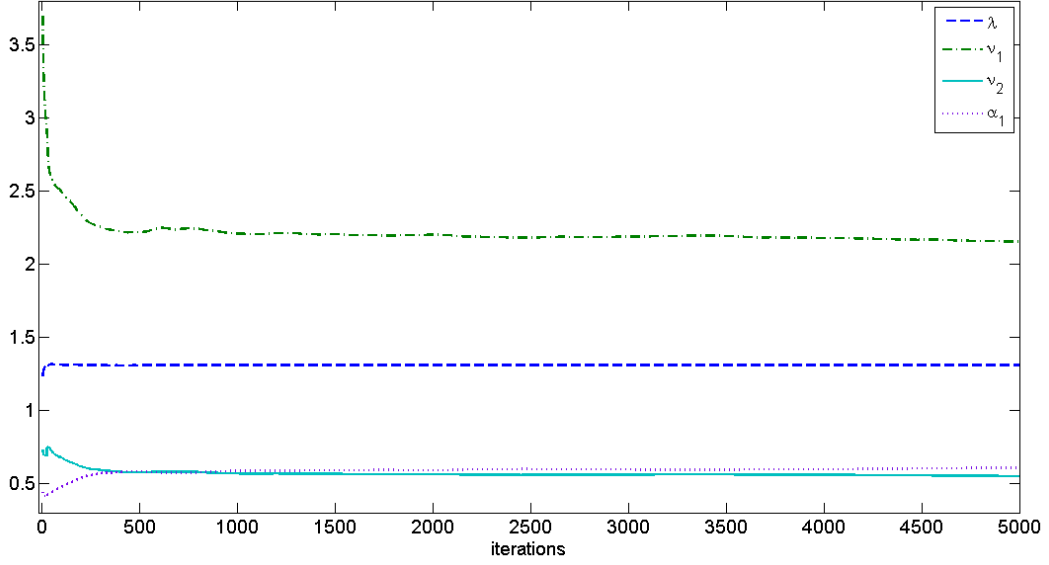


Figure 2.7: Evolution of the parameter estimates of a two-component model based on 5,000 observations

of the algorithm. The Gibbs sampler may be captured at a point from which it can hardly break out to explore the entire parameter space. A more meaningful control tool are Rao-Blackwellized Riemann control variates proposed in Gruet *et al.* (1999) and that can be adapted to our Gibbs sampler. This control tool is based on the property that every density integrates to one. As the Gibbs sampler generates a sample of the posterior distribution, a control variate can be constructed by using the sampled values to approximate the integral of the posterior density function by Riemann sums (Philippe, 1997). When the approximated integral is close to one, then the parameter space has been sufficiently explored and the algorithm shall have converged. Let ξ^l denote the l -th component of the parameter vector ξ . Then

$$1 = \int_{\Xi} \pi(\xi) d\xi = \int \int \pi(\xi^l | \xi^{(-l)}) d\xi^l \pi(\xi^{(-l)}) d\xi^{(-l)},$$

The inner integral can be approximated by an estimate based on Riemann sums

$$\sum_{s=1}^{S-1} (\xi_l^{(s+1)} - \xi_l^{(s)}) \pi(\xi_l^{(s)} | \xi^{(-l)}),$$

where S is the current number of iterations of the Gibbs sampling algorithm and $\xi_l^{(s)}$ denotes the s -th element of the ordered parameter values of ξ_l generated during the first S iterations. The outer integral is approximated by Monte-Carlo. Then, for each parameter ξ_l , the Rao-Blackwellized Riemann control variate is given by

$$\psi_S^l = \frac{1}{S} \sum_{s=1}^S (\xi_l^{(s+1)} - \xi_l^{(s)}) \sum_{t=1}^S \pi(\xi_l^{(s)} | \xi_t^{(-l)}).$$

Since all estimates ψ_S^l converge to the same value as $S \rightarrow \infty$, it is possible to compare the rate of convergence of the different parameters. Moreover, the following stopping rule can be used: When

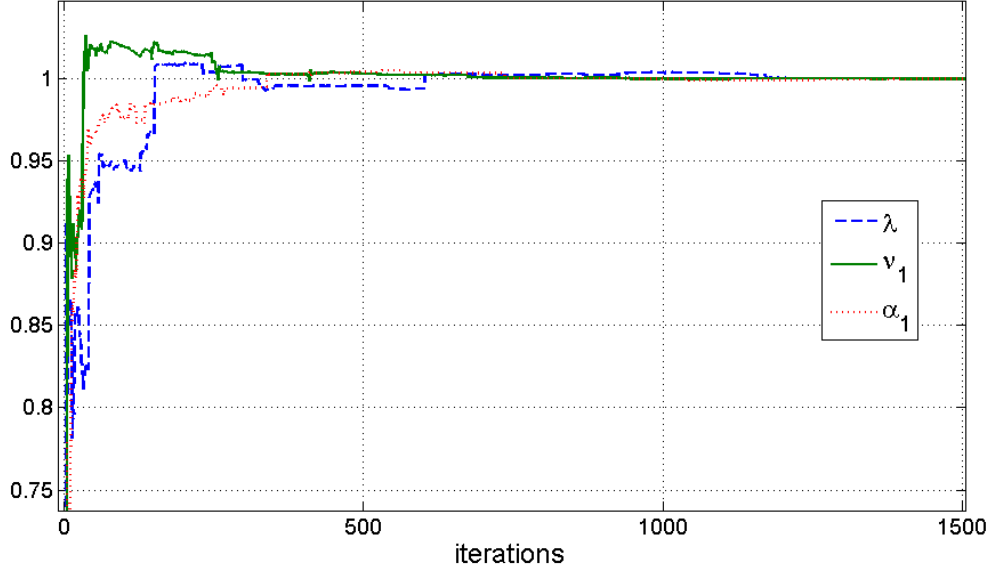


Figure 2.8: Evolution of the Rao-Blackwellized Riemann estimates of two-component model based on 500 observations ($\lambda = 0.9, \nu_1 = 1, \nu_2 = 0.1, \alpha_1 = 0.4$)

all estimates ψ_S^l fall within an interval around one, for example $[.99, 1.01]$, then the algorithm has converged.

In the Gibbs sampler for the pile-up model, we deduce the following control variates for the parameters λ, ϕ and the q_l

$$\begin{aligned}\psi_S^\lambda &= \frac{M}{S} \sum_{s=1}^S (\lambda^{(s+1)} - \lambda^{(s)}) e^{-M\lambda^{(s)}} \sum_{t=1}^S \frac{(M\lambda^{(s)})^{\sum_i \sum_k B_{ik}^t - 1}}{(\sum_i \sum_k B_{ik}^t - 1)!} \\ \psi_S^\phi &= \frac{1}{S} \sum_{s=1}^S (\phi^{(s+1)} - \phi^{(s)}) \sum_{t=1}^S \frac{(\phi^{(s)})^{\delta_t - 1} \gamma_t^{\delta_t} e^{-\phi^{(s)} \gamma_t}}{(\delta_t - 1)!} \\ \psi_S^{q_l} &= \frac{1}{S} \sum_{s=1}^S (q_l^{(s+1)} - q_l^{(s)}) \sum_{t=1}^S \frac{(q_l^{(s)})^{\sum_i B_{il}^t} (1 - q_l^{(s)})^{\sum_i \sum_{k>l} B_{ik}^t}}{\beta(\sum_i B_{il}^t + 1, \sum_i \sum_{k>l} B_{ik}^t + 1)},\end{aligned}$$

where $\beta(x, y) = \int_0^1 t^{x-1} (1-t)^{y-1} dt$ denotes the beta function of x and y and

$$\begin{aligned}\gamma_t &= \sum_{k=1}^K \tau_1^t \dots \tau_k^t \sum_{i=1}^M Z_i B_{ik}^t, \\ \delta_t &= \sum_{i=1}^M \mathbb{1}\left\{ \sum_{k=1}^K B_{ik}^t > 0 \right\}.\end{aligned}$$

Unfortunately, these control variates are of limited use, since the computation of several terms as for example the evaluation of the beta function quickly exceeds computational limits. Problems occur when the number of observations exceeds 500 or when λ is greater than 1. Furthermore,

Table 2.1: Simulation results of the Gibbs sampler for $K = 1, 2, 3$ components and 3000, 3000, 10.000 observations, resp.

| | $K = 1$ | | $K = 2$ | | | | $K = 3$ | | | | | |
|------------------|-----------|-------|-----------|---------|---------|------------|-----------|---------|---------|---------|------------|------------|
| | λ | ν | λ | ν_1 | ν_2 | α_1 | λ | ν_1 | ν_2 | ν_3 | α_1 | α_2 |
| true values | 3 | 0.1 | 1 | 6 | 0.5 | .75 | 1 | 5 | 1 | 0.1 | .33 | .33 |
| estimated values | 3.05 | .101 | .994 | 6.03 | .518 | .742 | 1.01 | 4.88 | .970 | .101 | .347 | .329 |

the variates $\psi_S^{\tau_i}$ are intractable because the normalization constant of the conditional density of τ_i must be known and this is an extremely time-consuming computation. However, Figure 2.8 illustrates the convergence for a two-component model ($\lambda = 0.9, \nu_1 = 1, \nu_2 = 0.1, \alpha_1 = 0.4$) with 500 observations. After 300 iterations all control variates differ from 1 less than 1 % and the estimates are $\hat{\lambda} = 0.877, \hat{\nu}_1 = 0.976, \hat{\nu}_2 = 0.1067, \hat{\alpha}_1 = 0.393$.

2.4 EXPERIMENTAL RESULTS OF THE GIBBS SAMPLER

In this section simulations are carried out to test the performance of the new Gibbs sampler. The variance of the posterior means obtained by the Gibbs sampler is compared to the Cramér-Rao bound and we state that a significant reduction of the acquisition time is possible in comparison to currently used methods in fluorescence. Furthermore, the performance of the Gibbs sampler is compared to the Coates method, which is an alternative method for pile-up observations.

First simulation results obtained for data simulated from models with different numbers of components K are represented in Table 2.1. Note that all estimated values are close to the true parameter values and, of course, by increasing the number of observations one may obtain even higher precision. Especially in the exponential case ($K = 1$) very good estimates are provided for a rather high intensity ($\lambda = 3$). For illustration the quantile-quantile plot for the two-component model is presented in Figure 2.9. It shows that the estimated distribution is close to the true one, which is also confirmed by a high p -value of the Kolmogorov-Smirnov test (0.984).

2.4.1 COMPARISON WITH THE CRAMÉR-RAO BOUND

As the Gibbs sampler provides a Bayes estimator, the Cramér-Rao bound does not exactly apply, since the prior distribution supplies information on the parameters. However, in our Gibbs sampler an improper prior is used, such that not much additional information is available. Hence, a comparison of the variance of the parameter estimates with the Cramér-Rao bound remains interesting.

Consider an illustrating example for a two-component model with $\lambda = 1.5, \nu_1 = 2, \nu_2 = 0.5, \alpha_1 = 0.3$ and 5.000 observations. From 50 simulations we obtain the following covariance

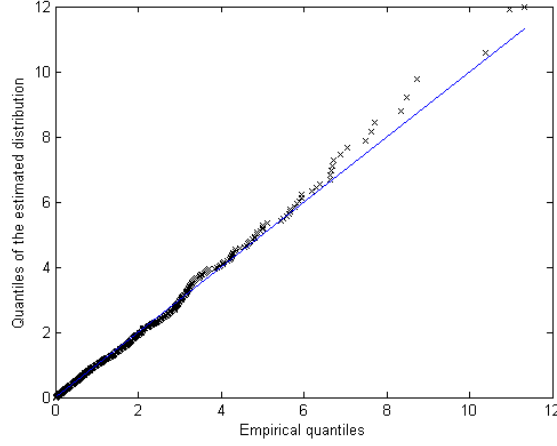


Figure 2.9: Quantile-quantile plot of the Gibbs sampler for the data of the two-component model of Table 2.1.

matrix for the estimates of $\lambda, \nu_1, \nu_2, \alpha_1$

$$10^{-3} \begin{pmatrix} 0.614 & -1.248 & 0.025 & -0.027 \\ -1.248 & 61.604 & 2.767 & -10.782 \\ 0.025 & 2.767 & 0.440 & -0.698 \\ -0.027 & -10.782 & -0.698 & 2.433 \end{pmatrix},$$

while the Cramér-Rao bound obtained by the inverse of a Monte-Carlo approximation of the Fisher information matrix is

$$10^{-3} \begin{pmatrix} 0.696 & 0.057 & -0.034 & -0.156 \\ 0.057 & 58.052 & 3.990 & -10.053 \\ -0.034 & 3.990 & 0.610 & -0.933 \\ -0.156 & -10.053 & -0.933 & 2.181 \end{pmatrix}.$$

Both matrices are quite close to each other, which means that the variance of the posterior means obtained by the Gibbs sampler is close to the Cramér-Rao bound.

More exhaustive simulations compare the variance of the Gibbs sampler to the Cramér-Rao bound in the single-exponential case for various values of λ . Indeed, the Gibbs sampling algorithm simplifies much in the single-exponential case, since all reparametrization becomes redundant. As there is a single component, the data augmentation step consists of only generating the number of photons $n_i \sim N|(Z_i, \xi)$. Then ν is generated from the Gamma distribution $\Gamma(\#\{i : Z_i < T\}, \sum_{i=1}^M n_i Z_i)$ and, if λ is unknown, λ is generated from the Gamma distribution $\Gamma(\sum_{i=1}^M n_i, M)$ where M denotes the number of observations. In the simulations the exponential parameter ν is chosen to be 1 and 1.000 observations from the pile-up model are generated on which the Gibbs sampler is evaluated. This is repeated 100 times to obtain an estimate of the variance of the estimator of the exponential parameter ν . In the set-up of Figure 2.10 λ is unknown and also estimated by the Gibbs sampler, while in Figure 2.11 λ is known. In both cases Figure 2.10 and 2.11 show that the posterior means obtained by the Gibbs sampler attain the Cramér-Rao bound for any value of λ . That means that the Gibbs sampler provides efficient parameter estimates.

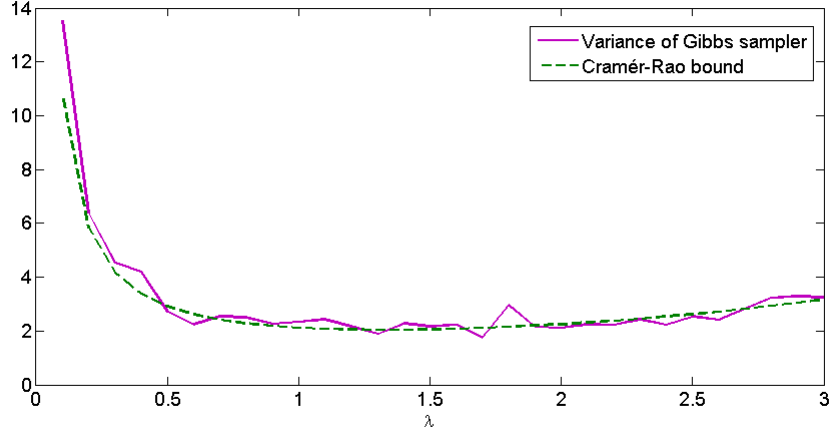


Figure 2.10: Variance of the Gibbs sampler compared to the Cramér-Rao bound in the single-exponential case when λ is *unknown*.

2.4.2 VARIANCE REDUCTION

Recall that our main goal is to obtain a method that deals with pile-up affected data (i.e. $\lambda > 0.05$) in order to reduce the required number of measurements M . We compare the Gibbs sampler to the following estimation practice. Data from the pile-up model are obtained at a low laser intensity ($\lambda = 0.05$) so that the probability for 2 or more photons per laser pulse is negligible. Then the observed arrival times, i.e. measurements strictly smaller than T , are considered as independent observations from the exponential mixture distribution given by (1.10) and a classical EM algorithm for this distribution is applied. Repeated simulations provide estimates of the bias and the variance of the estimators for a model with two components and various numbers of observations. For the same two-component model we simulated data with intensity $\lambda_{\text{opt}} = 1.32$ and applied the Gibbs sampler. From the results shown in Table 2.2 we first see that for both methods bias and variances decrease by increasing the number of observations. Second and more notable, any bias and any variance of the standard method exceed the corresponding value of the Gibbs sampler. Actually, comparing the results for 10.000 observations of the first method to the results for 1.000 observations of the new method shows that all values from the Gibbs sampler are smaller than the first. Thus, we obtain estimates of comparable statistical quality by using ten times less, but pile-up observations instead of data without pile-up. Hence, there is a real gain in acquisition time. The gain of a factor ten corresponds to the difference of the Cramér-Rao bound in the exponential case, where $CR_{\theta}(0.05, 1) \approx 20.8$ for $\lambda = 0.05$ and $CR_{\theta}(1.32, 1) \approx 2.04$ for $\lambda = 1.32$.

2.4.3 COMPARISON TO THE COATES METHOD

Finally, the Gibbs sampler is compared to the approach of Coates (1968), another method dealing with the pile-up case. Coates proposes a correction formula for histograms that works for any distribution F of photon arrival times in the Poisson case. Denote m_i the counts in the i -th bin of the histogram based on M laser excitations. Then the ‘corrected’ histogram that estimates the

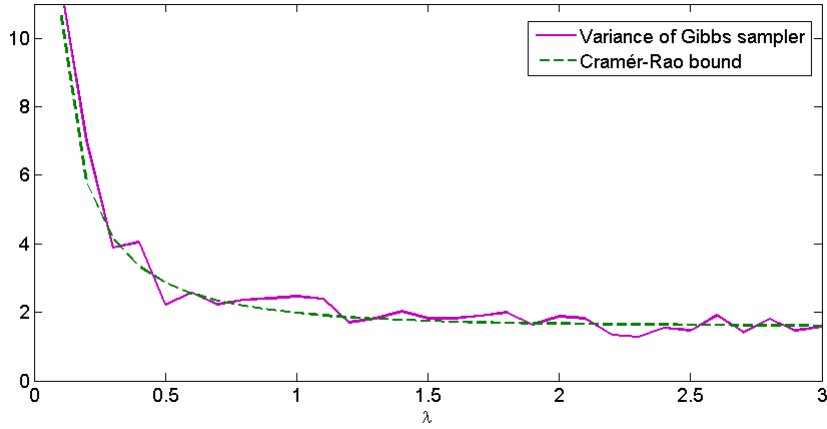


Figure 2.11: Variance of the Gibbs sampler compared to the Cramér-Rao bound in the single-exponential case when λ is *known*.

density of the distribution of the arrival times F is given by the new counts

$$n_i^c = \log \left(\frac{M - \sum_{j=1}^i m_j}{M - \sum_{j=1}^{i-1} m_j} \right).$$

Typically the Coates correction is applied in combination with least-squares curve fitting. However, least-squares belong to the class of large sample methods. Since our main interest is the reduction of the acquisition time, it is more adequate to replace the least-squares method with e.g. the EM algorithm to compute the maximum likelihood estimator. On small samples the combination Coates + EM should improve the performance of the combination Coates + Least-squares.

We applied the Coates method in the following way: a histogram from the pile-up distribution with multi-exponential target distribution is simulated with a bin width of 0.1. Then the Coates correction is applied and finally an EM algorithm for the exponential mixture distribution provides the parameter estimates. As the Coates correction requires the value of λ , the intensity is considered as known also in the Gibbs sampler. On the same data set the Gibbs sampler is applied twice, on the continuous data and on the histogram data. By repeated simulations we obtained estimates of the bias and the standard deviation of the estimators. The results for various model parameters are displayed in Table 2.3.

We notice that the performance of the Gibbs sampler applied on continuous data is superior to the method based on the Coates correction. However, the Gibbs sampler is very sensitive to the a loss of resolution in the data. Storing data in a histogram deteriorates the estimation quality of the Gibbs sampler. When histogram data are used, the Gibbs sampler is still better than the Coates method in the single-exponential case, but in the multi-exponential case the Coates method has the best performance.

Table 2.2: Comparison of the standard estimation method and the Gibbs sampler for a two-component model with true parameter values $\alpha_1 = .33, \alpha_2 = .66, \nu_1 = .5, \nu_2 = 6$.

| Standard estimation method ($\lambda = 0.05$) | | | | | |
|---|------|--------|--------|--------|--------|
| nb of obs | | 1000 | 3000 | 5000 | 10000 |
| α_1 | bias | 0.0051 | 0.0040 | 0.0036 | 0.0028 |
| | var | 0.0112 | 0.0035 | 0.0021 | 0.0010 |
| ν_1 | bias | 0.0488 | 0.0143 | 0.0098 | 0.0056 |
| | var | 0.0447 | 0.0092 | 0.0054 | 0.0025 |
| ν_2 | bias | 0.6523 | 0.2198 | 0.1626 | 0.1080 |
| | var | 6.6068 | 0.9788 | 0.5520 | 0.2606 |

| Gibbs sampler ($\lambda = 1.32$) | | | | | |
|------------------------------------|------|--------|--------|--------|--------------|
| nb of obs | | 1000 | 3000 | 5000 | 10000 |
| α_1 | bias | 0.0006 | 0.0001 | 0.0001 | $.492e^{-4}$ |
| | var | 0.0008 | 0.0003 | 0.0002 | 0.0001 |
| ν_1 | bias | 0.0049 | 0.0018 | 0.0010 | 0.0006 |
| | var | 0.0023 | 0.0008 | 0.0005 | 0.0002 |
| ν_2 | bias | 0.0278 | 0.0069 | 0.0057 | 0.0023 |
| | var | 0.1499 | 0.0491 | 0.0294 | 0.0147 |

2.5 DISCUSSION

In this chapter we analyzed the influence of the pile-up effect on the information bounds. The results confirm our intuition that the collection of data at a negligible pile-up effect is inefficient. We showed that in the Poisson case the Cramér-Rao bound is a decreasing function near 0. That means that increasing the pile-up effect results in an increase of information on the parameter θ_0 of the target distribution. It is very likely that this result continues to hold for other distributions than the Poisson distribution.

A more surprising result was obtained for pile-up models where the target family is a scale family. We showed that the minimum value of the information bound does not depend on the parameter θ_0 of the target distribution. For the single-exponential target family this optimal value was determined numerically. For the TCSPC application this result is of great use, as in an experimental set-up the Poisson parameter is determined by tuning the laser intensity. Hence, data acquisition can be carried out at the optimal intensity without knowledge of the exponential parameter.

When the Cramér-Rao bound can be computed numerically, then the reduction of the variance can even be quantified. For instance, in the single-exponential case, the Cramér-Rao bound at $\lambda = 0.05$ is about ten times the value of the Cramér-Rao bound at $\lambda_{\text{opt}} \approx 1.32$. This corresponds to the reduction of the variance of a factor ten for the Gibbs sampler.

In the second part of this chapter we have demonstrated that the Cramér-Rao bound can be attained for multi-exponential target models and Poisson distribution of the number N of photons per excitation cycle. Therefore, a Gibbs sampler that is well adapted to the pile-up effect using a

Table 2.3: Comparison of the bias and variance for the Coates correction and the Gibbs sampler, for models with $K = 1, 2, 3$ components and 1.000, 5.000, 10.000 observations, resp. The intensities are $\lambda = 1.5, 2$ and 1, resp.

| | Coates, bin width 0.1 | | Gibbs, continous data | | Gibbs, bin width 0.1 | |
|---------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| True value | bias | variance | bias | variance | bias | variance |
| $\nu_1 = 0.1$ | $7.2866e^{-4}$ | $(2.7006e^{-5})$ | $3.1255e^{-4}$ | $(1.8753e^{-5})$ | $5.4706e^{-4}$ | $(2.1616e^{-5})$ |

| True value | Coates, bin width 0.1 | | Gibbs, continous data | | Gibbs, bin width 0.1 | |
|------------------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|----------------------|----------|
| $\nu_1 = 3$ | 0.0620 | (0.0419) | 0.0177 | (0.0365) | 0.3273 | (0.0180) |
| $\nu_2 = 0.6$ | 0.0063 | (0.0043) | 0.0031 | (0.0036) | 0.0440 | (0.0033) |
| $\alpha_1 = 0.7$ | 0.0067 | (0.0018) | 0.0018 | (0.0017) | 0.0426 | (0.0014) |

| True value | Coates, bin width 0.1 | | Gibbs, continous data | | Gibbs, bin width 0.1 | |
|-------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| $\nu_1 = 3$ | 0.0976 | (0.0074) | 0.0288 | (0.0090) | 0.1800 | (0.0043) |
| $\nu_2 = 0.5$ | 0.0357 | (0.0010) | 0.0370 | (0.0051) | 0.1144 | (0.0200) |
| $\nu_2 = 0.1$ | 0.0064 | $(6.4739e^{-5})$ | 0.0068 | $(2.1425e^{-5})$ | 0.0193 | $(65.391e^{-5})$ |
| $\alpha_1 = 0.5$ | 0.0065 | $(19.525e^{-5})$ | 0.0055 | $(9.3236e^{-5})$ | 0.0021 | $(25.212e^{-5})$ |
| $\alpha_1 = 0.33$ | 0.0057 | $(6.3753e^{-4})$ | 0.0064 | $(6.7487e^{-4})$ | 0.0072 | $(6.3483e^{-4})$ |
| $\alpha_1 = 0.17$ | 0.0122 | $(2.7911e^{-4})$ | 0.0009 | $(3.2704e^{-4})$ | 0.0093 | $(6.6562e^{-4})$ |

new missing data scheme is provided. Numerical simulations show that the estimator is efficient for any value of the Poisson parameter.

Further simulations confirm the theoretical results concerning the important reduction of the Cramér-Rao bound when increasing the intensity λ . From the diminution of the variance it follows that less observations are necessary to obtain parameter estimates of the same accuracy. This results in a significant reduction of the acquisition time, which was our motivation for the study of the pile-up model.

The Gibbs sampler might be extended, as it is conceivable to include model selection in the algorithm. That means, if the number of mixture components is unknown, the Gibbs sampler should not only estimate the parameters θ and λ but also the mixture order K . One technique of model selection is based on reversible jumps as described by Green (1995). This method allows to jump between models of differing dimension. Moves between models are achieved by periodically proposing a move to a different model, and rejecting it with appropriate probability to ensure that the chain possesses the required stationary distribution. Gruet *et al.* (1999) apply reversible jumps in the exponential mixtures. In the same way reversible jumps might be used in the pile-up model.

Nevertheless, the Gibbs sampler is not really adapted to real fluorescence lifetime measurements. First, the computing time of the Gibbs sampler is long and increases with the number of observations and the intensity λ . A second drawback is that the Gibbs sampler is specifically elaborated for multi-exponential target distributions and a generalization to other target models is not automatic.

For instance, consider target distributions that are the convolution of a multi-exponential density with the known instrument response function, see (1.11). The vector of latent variables

(B_1, \dots, B_K) defined in Subsection 2.3.1 is no longer sufficient. In addition, one has to consider the additive noise coming from the instrument for all $N = \sum B_k$ photons. This significant augmentation of the latent variables increases the computing time even more.

We conclude that although the Gibbs sampler is not adapted to real fluorescence lifetime measurements, the simulation results obtained with the Gibbs sampler are very promising. They confirm our intuitive thinking that the acquisition time can be significantly reduced in the pile-up model. It remains to find an adequate estimator. In the following chapter we will present a more general estimation approach that will be more adapted to the fluorescence context.

2.6 PROOFS

PROOF OF LEMMA 2.1

Using the definition of Z in (1.2) and the assumptions on N and $\{Y_k, k \geq 1\}$, the survival function $1 - G(z)$ is given for all $z \in \mathbb{R}_+$ by

$$\begin{aligned} \mathbb{P}(Z > z) &= p_\lambda(0) + \sum_{n=1}^{\infty} p_\lambda(n) \mathbb{P}(Y_i > z, i = 1, \dots, n \mid N = n) \\ &= \sum_{n=0}^{\infty} p_\lambda(n) (1 - F(z))^n \\ &= M(1 - F(z)). \end{aligned}$$

Using that $\mathbb{P}(Z = \infty) = \lim_{z \rightarrow \infty} \mathbb{P}(Z > z)$, we get that $\mathbb{P}(Z = \infty) = M(0)$. Relation (2.1) follows.

If f is continuous, Relation (2.2) follows by differentiating the right-hand side of (2.1). The general case is obtained by a density argument. Let (f_n) be a sequence of continuous densities tending to f in the L^1 sense, $\int |f_n - f| d\mathcal{L}_+ \rightarrow 0$ as $n \rightarrow \infty$. For each n we denote by F_n the distribution function of the density f_n , and by G_n and g_n the distribution function and density defined by (2.1) and (2.2), respectively. We get that F_n converge to F uniformly, $\sup_y |F_n(y) - F(y)| \rightarrow 0$ as $n \rightarrow \infty$ and, using the properties of M and \dot{M} , that $\sup_z |G_n(z) - G(z)| \rightarrow 0$ and $\int_z^\infty |g_n - g| d\mathcal{L}_+ \rightarrow 0$ as $n \rightarrow \infty$ for any z such that $F(z) > 0$. It follows that G admits g as a density.

PROOF OF THEOREM 2.2

We consider below the differentiability of $\zeta_{\lambda, \theta}$ as an element of $L^2(\mathcal{L}_+)$. The extension to $L^2(\overline{\mathcal{L}_+})$ is immediate in (2.4) because $\zeta_{\lambda, \theta}(\infty)$ does not depend on θ and in (2.5) as an application of Condition (v). Let us first show that the model $\{g_{\theta, \lambda_0}, \theta \in \Theta\}$ is Hellinger differentiable at θ_0 for some given λ_0 . Let $L^\infty(\mathcal{L}_+)$ denote the space of functions which are \mathcal{L}_+ -essentially bounded, and $\|\cdot\|_\infty$ denote the corresponding norm. By Lemma 2.1, we have

$$\zeta_{\lambda_0, \theta} = \xi_\theta \dot{M}_{\lambda_0}^{1/2} (1 - F_\theta).$$

Consider the function $G : L^2(\mathcal{L}_+) \rightarrow L^\infty(\mathcal{L}_+)$ defined by

$$G(\xi)(z) = \int_z^\infty \xi^2(t) dt,$$

and the function H with values in $L^\infty(\mathcal{L}_+)$, defined on the unit ball of $L^\infty(\mathcal{L}_+)$ by

$$H(\mathbf{u}) = \dot{M}_{\lambda_0} \circ \mathbf{u}.$$

By (i) and using the differentiability of $(\mathbf{u}, \mathbf{v}) \mapsto \mathbf{u} \times \mathbf{v}$ defined from $L^2(\mathcal{L}_+) \times L^\infty(\mathcal{L}_+) \rightarrow L^2(\mathcal{L}_+)$, the differentiability (2.4) at θ_0 follows from that of $\theta \mapsto \sqrt{H} \circ G \circ \xi_\theta$ as a function

valued in $L^\infty(\mathcal{L}_+)$. Observe that G is differentiable at every point $\xi \in L^2(\mathcal{L}_+)$, with derivative function $\dot{G}_\xi : L^2(\mathcal{L}_+) \rightarrow L^\infty(\mathcal{L}_+)$ given by

$$\dot{G}_\xi(\mathbf{u})(z) = 2 \int_z^\infty \xi(t)\mathbf{u}(t) dt, z \in \mathbb{R}_+ .$$

We next show that \sqrt{H} is differentiable at any point of the set of non-negative functions in the unit ball of $L^\infty(\mathcal{L}_+)$ and conclude (2.7) by using that the derivative of a composition is the composition of derivatives. By (ii), the function \dot{M}_{λ_0} is twice continuously differentiable on $[-1, 1]$ with first derivative \ddot{M}_{λ_0} and second derivative bounded by $\mathbb{E}_{\lambda_0}\{N(N-1)(N-2)\}$. Hence, for all $t, s \in [-1, 1]$,

$$\dot{M}_{\lambda_0}(t) = \dot{M}_{\lambda_0}(s) + (t-s)\ddot{M}_{\lambda_0}(s) + r(t-s) , \quad (2.20)$$

where $|r(x)| \leq \mathbb{E}_{\lambda_0}\{N(N-1)(N-2)\}x^2/2$. Applying (2.20), we obtain that H is differentiable at any \mathbf{u} in the unit ball of $L^\infty(\mathcal{L}_+)$ with derivative $\mathbf{v} \mapsto \mathbf{v} \times \ddot{M}_{\lambda_0} \circ \mathbf{u}$. Similarly, using (iii), since $\dot{M}_{\lambda_0}(u) \geq p_{\lambda_0}(1)$ for all $u \in [0, 1]$ and the square root function is twice continuously differentiable on \mathbb{R}_+ with a second derivative uniformly bounded on $[p_{\lambda_0}(1), \infty)$, we get that \sqrt{H} is differentiable at any non-negative \mathbf{u} in the unit ball of $L^\infty(\mathcal{L}_+)$ with derivative $\mathbf{v} \mapsto (\mathbf{v}/2)\ddot{M}_{\lambda_0}\dot{M}_{\lambda_0}^{-1/2} \circ \mathbf{u}$.

Let us now prove the Hellinger differentiability of $\zeta_{\lambda, \theta}$ at (λ_0, θ_0) . We write

$$\zeta_{\lambda, \theta} - \zeta_{\lambda_0, \theta_0} = \zeta_{\lambda, \theta} - \zeta_{\lambda, \theta_0} + \zeta_{\lambda, \theta_0} - \zeta_{\lambda_0, \theta_0} . \quad (2.21)$$

For any $\lambda \in \Lambda$ we have

$$\begin{aligned} & \sup_{\theta \in \Theta} \left\| \dot{M}_\lambda(1 - F_\theta) - \dot{M}_{\lambda_0}(1 - F_\theta) - (\lambda - \lambda_0)\ddot{M}_{\lambda_0}(1 - F_\theta) \right\|_\infty \\ & \leq \sum_{k \geq 1} |p_\lambda(k) - p_{\lambda_0}(k) - (\lambda - \lambda_0)\check{p}_{\lambda_0}(k)| \\ & = o(|\lambda - \lambda_0|) , \end{aligned}$$

where the o -term holds as $\lambda \rightarrow \lambda_0$ and follows from Condition (iv). Since for all $u \in [0, 1]$, $\dot{M}_{\lambda_0}(u) \geq p_{\lambda_0}(1) > 0$ and $|\ddot{M}_{\lambda_0}(u)| \leq \sum_{k \geq 1} k|\check{p}_{\lambda_0}(k)| < \infty$, we obtain that, as $\lambda \rightarrow \lambda_0$,

$$\sup_{\theta \in \Theta} \left\| \dot{M}_\lambda^{1/2}(1 - F_\theta) - \dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_\theta) - (\lambda - \lambda_0) \frac{\ddot{M}_{\lambda_0}(1 - F_\theta)}{2\dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_\theta)} \right\|_\infty = o(|\lambda - \lambda_0|) .$$

Thus, since $\|\xi_\theta\|_2 = 1$ for all $\theta \in \Theta$ and $\|\mathbf{u}\mathbf{v}\|_2 \leq \|\mathbf{u}\|_2\|\mathbf{v}\|_\infty$, multiplying the previous equation by ξ_θ yields, as $\lambda \rightarrow \lambda_0$,

$$\sup_{\theta \in \Theta} \left\| \zeta_{\lambda, \theta} - \zeta_{\lambda_0, \theta_0} - (\lambda - \lambda_0) \frac{\xi_\theta \ddot{M}_{\lambda_0}(1 - F_\theta)}{2\dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_\theta)} \right\|_2 = o(|\lambda - \lambda_0|) .$$

Observe that \dot{M}_{λ_0} is continuous and positively lower bounded on $[0, 1]$, \ddot{M}_{λ_0} is continuous on $[0, 1]$ since $\sum_{k \geq 1} k|\check{p}_{\lambda_0}(k)| < \infty$, $\theta \mapsto \xi_\theta$ is continuous at θ_0 as a map valued in $L^2(\mathcal{L}_+)$ and $\theta \mapsto 1 - F_\theta$ is continuous at θ_0 as a map valued in $L^\infty(\mathcal{L}_+)$. Hence, as $\theta \rightarrow \theta_0$,

$$\left\| \frac{\xi_\theta \ddot{M}_{\lambda_0}(1 - F_\theta)}{2\dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_\theta)} - \frac{\xi_{\theta_0} \ddot{M}_{\lambda_0}(1 - F_{\theta_0})}{2\dot{M}_{\lambda_0}^{1/2}(1 - F_{\theta_0})} \right\|_2 \rightarrow 0 .$$

On the other hand, the previously proved Hellinger differentiability of $\zeta_{\lambda_0, \theta_0}$ at θ_0 implies that, as $\theta \rightarrow \theta_0$,

$$\|\zeta_{\lambda_0, \theta} - \zeta_{\lambda_0, \theta_0} - (\theta - \theta_0)^T \partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0}\|_2 = o(\|\theta - \theta_0\|).$$

The two last displays and (2.21) conclude the proof.

PROOF OF THEOREM 2.6

Using (2.5), we obtain

$$I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) = 4 \int (\partial_\lambda \zeta_{\lambda_0, \theta_0})^2 d\overline{\mathcal{L}}_+ = \int_0^\infty \frac{\xi_{\theta_0}^2(z) \check{M}_{\lambda_0}^2(1 - F_{\theta_0}(z))}{\dot{M}_{\lambda_0}(1 - F_{\theta_0}(z))} dz + \frac{\check{p}_{\lambda_0}^2(0)}{p_{\lambda_0}(0)}.$$

Let X be a random variable with density $\xi_{\theta_0}^2$. As its distribution function F_{θ_0} is continuous, $F_{\theta_0}(X)$ has uniform distribution on $[0, 1]$ (see Devroye, 1986). Consequently,

$$\int_0^\infty \frac{\xi_{\theta_0}^2(z) \check{M}_{\lambda_0}^2(1 - F_{\theta_0}(z))}{\dot{M}_{\lambda_0}(1 - F_{\theta_0}(z))} dz = \mathbb{E} \left\{ \frac{\check{M}_{\lambda_0}^2(1 - F_{\theta_0}(X))}{\dot{M}_{\lambda_0}(1 - F_{\theta_0}(X))} \right\} = \int_0^1 \frac{\check{M}_{\lambda_0}^2(u)}{\dot{M}_{\lambda_0}(u)} du.$$

This completes the proof.

PROOF OF THEOREM 2.7

The proof of Theorem 2.7 relies on the following Lemmas 2.11 and 2.12.

Lemma 2.11. *Let, for all $\lambda > 0$,*

$$A_\lambda = \begin{bmatrix} a_\lambda & \lambda b_\lambda^T \\ \lambda b_\lambda & \lambda d_\lambda \end{bmatrix},$$

where $a_\lambda \in \mathbb{R}$, $b_\lambda = (b_{\lambda,1}, \dots, b_{\lambda,p})^T \in \mathbb{R}^p$ and $d_\lambda \in \mathbb{R}^{p \times p}$. Suppose that

$$b_\lambda = O(1), \quad \lambda a_\lambda \rightarrow 1 \text{ and } d_\lambda \rightarrow d \text{ when } \lambda \rightarrow 0,$$

where d is an invertible matrix. Then, when $\lambda \rightarrow 0$,

$$\det(A_\lambda) \sim \lambda^{p-1} \det(d).$$

Further, denote the two diagonal blocks of the inverse of A_λ by m_λ and M_λ , where m_λ is a scalar and M_λ a $p \times p$ matrix,

$$A_\lambda^{-1} = \begin{bmatrix} m_\lambda & \dots \\ \vdots & M_\lambda \end{bmatrix}.$$

Then, when $\lambda \rightarrow 0$,

$$m_\lambda \sim \lambda \quad \text{and} \quad M_\lambda \sim \frac{d^{-1}}{\lambda}.$$

Proof of Lemma 2.11. Using the Laplace expansion for the determinant of A_λ along the first row, we obtain with the notation $d_\lambda^{- (j)}$ for the $p \times (p - 1)$ matrix that results from d_λ by removing the j -th column,

$$\det(A_\lambda) = a_\lambda \lambda^p \det(d_\lambda) + \sum_{j=1}^p (-1)^{j+1} b_{\lambda,j} \lambda^{p+1} \det \left(\left[b_\lambda^T, d_\lambda^{- (j)} \right] \right) .$$

Further,

$$\det \left(\left[b_\lambda^T, d_\lambda^{- (j)} \right] \right) = \sum_{k=1}^p (-1)^{k+1} b_{\lambda,k} \det \left(d_\lambda^{- (k,j)} \right) ,$$

where the $(p - 1) \times (p - 1)$ matrix $d_\lambda^{- (k,j)}$ results from d_λ by removing the k -th row and the j -th column. By the assumptions of the theorem it follows $\det(A_\lambda) = \lambda^p a_\lambda \det(d_\lambda) + O(\lambda^{p+1}) \sim \lambda^{p-1} \det(d)$, as $\lambda \rightarrow 0$. For the second part of the theorem, we use the representation of the inverse matrix using minors. For all $i, j > 1$ we have, similarly as above,

$$\begin{aligned} (A_\lambda^{-1})_{i,j} &= \frac{(-1)^{i+j}}{\det(A_\lambda)} \left(a_\lambda \lambda^{p-1} \det \left(d_\lambda^{- (i-1,j-1)} \right) + O(\lambda^p) \right) \\ &= \frac{(-1)^{i+j} \det \left(d_\lambda^{- (i-1,j-1)} \right)}{\lambda \det(d)} + o \left(\frac{1}{\lambda} \right) = \frac{(d^{-1})_{i,j}}{\lambda} + o \left(\frac{1}{\lambda} \right) . \end{aligned}$$

And finally, to complete the proof, we get $(A_\lambda^{-1})_{1,1} = \frac{\lambda^p \det(d_\lambda)}{\det(A_\lambda)} \sim \lambda$, as $\lambda \rightarrow 0$. \square

Lemma 2.12. *If a collection of densities $\mathcal{P} = \{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ has a Hellinger derivative $\dot{\xi}_{\theta_0}$ in θ_0 , and if θ_0 is an interior point of Θ , then $\int \dot{\xi}_{\theta_0}(z) \xi_{\theta_0}(z) dz = 0$.*

Proof of Lemma 2.12. Differentiating the relationship $\int \xi_\theta^2(z) dz = 1$ yields the Lemma (see Polard, 2001; Bickel *et al.*, 1998). \square

Proof of Theorem 2.7. The random variable X defined in (2.13) has a density with respect to $\overline{\mathcal{L}}_+$ given by

$$h_{\lambda,\theta}(x) = \begin{cases} f_\theta(x)(1 - e^{-\lambda}) & \text{if } x \in \mathbb{R}_+ \\ e^{-\lambda} & \text{if } x = \infty . \end{cases} \quad (2.22)$$

First we show that the Cramér-Rao bound associated with the model $\{h_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ is given by

$$CR^h(\lambda_0, \theta_0) = \begin{bmatrix} e^{\lambda_0} - 1 & 0 \\ 0 & \frac{(I^f)^{-1}(\theta_0)}{1 - e^{-\lambda_0}} \end{bmatrix} . \quad (2.23)$$

The family $\{h_{\lambda,\theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$ is a pile-up model with N having Bernoulli distribution with $\mathbb{P}(N = 1) = 1 - e^{-\lambda}$. Set $\rho_{\lambda_0, \theta_0} \equiv \sqrt{h_{\lambda_0, \theta_0}}$. Applying Theorem 2.2 gives the Hellinger differentiability at (λ_0, θ_0) with derivative

$$\begin{aligned} \partial_\lambda \rho_{\lambda_0, \theta_0}(x) &= \begin{cases} \frac{-\xi_{\theta_0}(x) e^{-\lambda_0}}{2\sqrt{1 - e^{-\lambda_0}}} & \text{if } x \in \mathbb{R}_+ \\ -\frac{e^{-\lambda_0/2}}{2} & \text{if } x = \infty , \end{cases} \\ \partial_\theta \rho_{\lambda_0, \theta_0}(x) &= \begin{cases} \sqrt{1 - e^{-\lambda_0}} \dot{\xi}_{\theta_0}(x) & \text{if } x \in \mathbb{R}_+ \\ 0 & \text{if } x = \infty . \end{cases} \end{aligned}$$

Obviously, we obtain for the Fisher information $I^h(\lambda_0, \theta_0)$ of $\{h_{\lambda, \theta}, (\lambda, \theta) \in \Lambda \times \Theta\}$

$$I_{\lambda}^h(\lambda_0, \theta_0) = 4 \int (\partial_{\lambda} \rho_{\lambda_0, \theta_0})^2 d\overline{\mathcal{L}}_+ = \frac{e^{-2\lambda_0}}{1 - e^{-\lambda_0}} \int_0^{\infty} \xi_{\theta_0}^2(x) dx + e^{-\lambda_0} = \frac{1}{e^{\lambda_0} - 1}, \quad (2.24)$$

and

$$I_{\theta}^h(\lambda_0, \theta_0) = 4(1 - e^{-\lambda_0}) \int_0^{\infty} \dot{\xi}_{\theta_0}(x) \dot{\xi}_{\theta_0}^T(x) dx = (1 - e^{-\lambda_0}) I^f(\theta_0). \quad (2.25)$$

Finally, by applying Lemma 2.12, it follows that

$$I_{\lambda, \theta}^h(\lambda_0, \theta_0) = 4 \int_0^{\infty} \partial_{\lambda} \rho_{\lambda_0, \theta_0}(x) \partial_{\theta} \rho_{\lambda_0, \theta_0}(x) dx = 2e^{-\lambda_0} \int_0^{\infty} \xi_{\theta_0}(x) \dot{\xi}_{\theta_0}(x) dx = 0. \quad (2.26)$$

Inverting the Fisher information matrix

$$I^h(\lambda_0, \theta_0) = \begin{pmatrix} I_{\lambda}^h(\lambda_0, \theta_0) & 0 \\ 0 & I_{\theta}^h(\lambda_0, \theta_0) \end{pmatrix}$$

yields (2.23). Now we show that the following asymptotic equivalences hold, as $\lambda_0 \rightarrow 0$,

$$I_{\lambda}^h(\lambda_0, \theta_0) \sim \lambda_0^{-1} \quad \text{and} \quad I_{\lambda}^g(\lambda_0, \theta_0) - I_{\lambda}^h(\lambda_0, \theta_0) = O(\lambda_0), \quad (2.27)$$

$$I_{\theta}^h(\lambda_0, \theta_0) \sim \lambda_0 I^f(\theta_0) \quad \text{and} \quad I_{\theta}^g(\lambda_0, \theta_0) - I_{\theta}^h(\lambda_0, \theta_0) = O(\lambda_0^2), \quad (2.28)$$

$$I_{\lambda, \theta}^h(\lambda_0, \theta_0) = 0 \quad \text{and} \quad I_{\lambda, \theta}^g(\lambda_0, \theta_0) = O(\lambda_0). \quad (2.29)$$

Combining (2.12) and (2.24) yields (2.27). To establish (2.28), applying Theorem 2.2 in the Poisson case (see (1.6) and (2.8)), and using the notation therein, we obtain, for all $z \in \mathbb{R}_+$,

$$\partial_{\theta} \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(z) = \sqrt{\lambda_0} e^{-\lambda_0 F_{\theta_0}(z)/2} \left[\dot{\xi}_{\theta_0}(z) + \lambda_0 \xi_{\theta_0}(z) \int_z^{\infty} \dot{\xi}_{\theta_0}(t) \xi_{\theta_0}(t) dt \right].$$

By the Cauchy–Schwarz Inequality and since $\|\xi_{\theta_0}\|_2 = 1$, we have

$$\sup_{z \geq 0} \left| \int_z^{\infty} \dot{\xi}_{\theta_0}(t) \xi_{\theta_0}(t) dt \right| \leq \|\dot{\xi}_{\theta_0}\|_2.$$

Using $\sup_z |1 - e^{-\lambda_0 F_{\theta_0}(z)/2}| \leq |1 - e^{-\lambda_0/2}|$ and the two previous displays, we obtain

$$\left\| \partial_{\theta} \zeta_{\lambda_0, \theta_0} - \sqrt{\lambda_0} \dot{\xi}_{\theta_0} \right\|_2 = O(\lambda_0^{3/2}), \quad \text{as } \lambda_0 \rightarrow 0.$$

This combined with (2.25) yields (2.28). Further applying Theorem 2.2 and using similar arguments as above and Lemma 2.12 yields (2.29). Apply Lemma 2.11 and (2.24)–(2.26) complete the proof of the theorem. \square

PROOF OF LEMMA 2.8

Let $\{f_{\theta}, \theta > 0\}$ be Hellinger differentiable at $\theta = 1$ with derivative $\dot{\xi}_1(x)$ and let $\theta_0 > 0$. Denote

$$r_{\theta}(x) = \xi_{\theta}(x) - \xi_1(x) - (\theta - 1) \dot{\xi}_1(x),$$

then $\|r_\theta\|_2 = o(|\theta - 1|)$ as $\theta \rightarrow 1$. As $\{f_\theta, \theta > 0\}$ is a scale family, one can show by changing variables that

$$\begin{aligned} \left\| \xi_\theta(x) - \xi_{\theta_0}(x) - \frac{(\theta - \theta_0)}{\sqrt{\theta_0}} \dot{\xi}_1(\theta_0 x) \right\|_2^2 &= \int_0^\infty \left(\xi_{\theta/\theta_0}(u) - \xi_1(u) - \left(\frac{\theta}{\theta_0} - 1 \right) \dot{\xi}_1(u) \right)^2 du \\ &= \|r_{\theta/\theta_0}\|_2^2. \end{aligned}$$

Since $\|r_{\theta/\theta_0}\|_2 = o(|\theta/\theta_0 - 1|) = o(|\theta - \theta_0|)$, as $\theta \rightarrow \theta_0$, we obtain the Hellinger differentiability at θ_0 with the given derivative. The converse is shown in the same way.

PROOF OF THEOREM 2.9

Lemma 2.8 implies the Hellinger differentiability of $\{f_\theta, \theta > 0\}$ at any $\theta_0 > 0$ with derivative given by

$$\dot{\xi}_{\theta_0}(x) = \frac{1}{\sqrt{\theta_0}} \dot{\xi}_1(\theta_0 x).$$

By applying Theorem 2.2, we have

$$\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(\infty) = \partial_\theta \zeta_{\lambda_0, 1}(\infty) = 0 \quad \text{and} \quad \partial_\lambda \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(\infty) = \partial_\lambda \zeta_{\lambda_0, 1}(\infty).$$

Further, using that $F_{\theta_0}(z) = F_1(\theta_0 z)$, $\xi_{\theta_0}(x) = \sqrt{\theta_0} \xi_1(\theta_0 x)$ and

$$\int_z^\infty \xi_1(\theta_0 t) \dot{\xi}_1(\theta_0 t) dt = \frac{1}{\theta_0} \int_{\theta_0 z}^\infty \xi_1(t) \dot{\xi}_1(t) dt, \quad z \in \mathbb{R}_+,$$

gives for all $z \in \mathbb{R}_+$,

$$\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(z) = \frac{1}{\sqrt{\theta_0}} \partial_\theta \zeta_{\lambda_0, 1}(\theta_0 z) \quad \text{and} \quad \partial_\lambda \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(z) = \sqrt{\theta_0} \partial_\lambda \zeta_{\lambda_0, 1}(\theta_0 z).$$

Therefore,

$$I_\theta(\lambda_0, \theta_0) = 4 \int_0^\infty (\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, \theta_0}(z))^2 dz = \frac{4}{\theta_0^2} \int_0^\infty (\partial_\theta \zeta_{\lambda_0, 1}(z))^2 dz = \frac{1}{\theta_0^2} I_\theta(\lambda_0, 1), \quad (2.30)$$

and, likewise, $I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0) = \frac{1}{\theta_0} I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, 1)$. Note that $I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) = I_\lambda(\lambda_0, 1)$, by Theorem 2.6. The theorem follows by applying the preceding relations to the inverse of the 2×2 Fisher information matrix

$$CR(\lambda_0, \theta_0) = \frac{1}{I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) I_\theta(\lambda_0, \theta_0) - I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0)^2} \begin{bmatrix} I_\theta(\lambda_0, \theta_0) & -I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0) \\ -I_{\lambda, \theta}(\lambda_0, \theta_0) & I_\lambda(\lambda_0, \theta_0) \end{bmatrix}.$$

PROOF OF THEOREM 2.10

To prove Theorem 2.10, we first note that the following property holds for the functions $b_\lambda(m, n)$ defined by (2.16).

Lemma 2.13. *For all $m \geq n \geq 1$, we have $b_\lambda(m, n) = o(\lambda^{-n} e^\lambda)$ as $\lambda \rightarrow \infty$.*

Proof of Lemma 2.13. The result follows by applying n times Hospital's rule to

$$\begin{aligned}
\lim_{\lambda \rightarrow \infty} \frac{\lambda^n b_\lambda(m, n)}{e^\lambda} &= \lim_{\lambda \rightarrow \infty} \frac{m! \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda^{k+n}}{k!(k+n)^{m+1}}}{e^\lambda} = \lim_{\lambda \rightarrow \infty} \frac{m! \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda^k (k+n) \dots (k+1)}{k!(k+n)^{m+1}}}{e^\lambda} \\
&\leq m! \lim_{\lambda \rightarrow \infty} e^{-\lambda} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda^k}{k!(k+n)^{m+1-n}} \leq m! \lim_{\lambda \rightarrow \infty} e^{-\lambda} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda^k}{(k+1)!} \\
&= m! \lim_{\lambda \rightarrow \infty} \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda} = 0.
\end{aligned}$$

□

Proof of Theorem 2.10. Without loss of generality take $\theta_0 = 1$, by Theorem 2.9. By Lemma 2.13, the terms $e^{-\lambda_0} \lambda_0 b_{\lambda_0}(2, 1)$, $e^{-\lambda_0} \lambda_0 b_{\lambda_0}(1, 1)$ and $e^{-\lambda_0} \lambda_0^2 b_{\lambda_0}(2, 2)$ of I_θ tend to 0 as $\lambda_0 \rightarrow \infty$. By applying Hospital's rule to the first term three times and to the second term two times, we obtain

$$\begin{aligned}
&\lim_{\lambda_0 \rightarrow \infty} \left| e^{-\lambda_0} \lambda_0^3 b_{\lambda_0}(2, 3) - 2e^{-\lambda_0} \lambda_0^2 b_{\lambda_0}(1, 2) \right| \\
&= 2 \left| \lim_{\lambda_0 \rightarrow \infty} e^{-\lambda_0} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda_0^k (k+1)(k+2)}{k!(k+3)^2} - 2 \lim_{\lambda_0 \rightarrow \infty} e^{-\lambda_0} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda_0^k (k+1)}{k!(k+2)} \right| \\
&= 2 \lim_{\lambda_0 \rightarrow \infty} e^{-\lambda_0} \left| \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda_0^k}{k!} \frac{2k^2 + 7k + 5}{k^3 + 8k^2 + 21k + 18} \right| \\
&\leq 28 \lim_{\lambda_0 \rightarrow \infty} e^{-\lambda_0} \left| \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\lambda_0^k}{(k+1)!} \right| \\
&= 0.
\end{aligned}$$

Thus $e^{-\lambda_0} \lambda_0^3 b_{\lambda_0}(2, 3) - 2e^{-\lambda_0} \lambda_0^2 b_{\lambda_0}(1, 2)$ tends to 0 as $\lambda_0 \rightarrow \infty$. This implies that $I_\theta(\lambda_0, 1)$ tends to 1 as $\lambda_0 \rightarrow \infty$, and (2.30) gives (2.17). □

CHAPTER 3

CORRECTED MAXIMUM LIKELIHOOD ESTIMATOR

This chapter is concerned with the estimation of the parameters of the target distribution based on a sample of pile-up observations. In contrast to the Gibbs sampler of Chapter 2, we seek an efficient estimator that is applicable for a large variety of target distributions as e.g. multi-exponential models with additive noise. Moreover, the estimator should not be computationally intensive.

In Section 3.2 we develop the so-called *corrected maximum likelihood estimator* (corrected MLE) defined as a maximizer of the *corrected likelihood*. The corrected likelihood is a likelihood-based contrast that is generally much easier to maximize than the likelihood associated with the pile-up model. Indeed, the complexity of maximizing the corrected likelihood is the same as maximizing the likelihood associated with the target distribution. In particular, if the EM-algorithm applies to the likelihood of the target distribution, then it applies similarly to the corrected likelihood.

The asymptotic behavior of the corrected MLE is studied in Section 3.3 by using the fact that the corrected likelihood function can be written as an L -statistic, i.e. a linear combination of order statistics. The corrected MLE is shown to be consistent under mild conditions. Furthermore, conditions under which the estimator is asymptotically normal are established. For this purpose a central limit theorem for L -statistics is developed in Appendix B. An estimator of the limit variance is given so that asymptotic confidence intervals can be constructed.

The performance of the corrected MLE is evaluated in Section 3.4 on TCSPC fluorescence lifetime measurements as well as on synthetic data. The corrected MLE is shown to achieve the Cramér-Rao bound for a large range of intensities λ . A numerical study shows that the corrected MLE is well suited for TCSPC data. Moreover, a significant reduction of the variance is noticed compared to standard methods used in fluorescence.

Furthermore, if the target distribution is an infinite mixture of exponential distributions, then the aim is the estimation of the mixing density. Therefore, we evaluate the corrected MLE on a large grid of fixed mixture components by using an acceleration of the EM algorithm proposed by Pilla & Lindsay (2001) to compute a kind of corrected nonparametric maximum likelihood estimator of the mixing density.

3.1 GENERAL SETTING AND NOTATION

In this chapter the pile-up model from Definition 1.1 is considered with target distribution F on the positive half-line. As we are concerned with the estimation of θ_0 , observations where no photon is emitted are without interest as they do not provide any information on the parameter of interest. To avoid dealing with infinite values, observations equal to ∞ are typically discarded from the sample. That means, that we can consider pile-up models where the distribution of N is restricted on \mathbb{N}^* . It follows by Lemma 2.1 that the pile-up distribution function G of Z is given by

$$G(z) = 1 - M(1 - F(z)), \quad z \in \mathbb{R}_+, \quad (3.1)$$

where M is the probability generating function associated with N , defined as $M(u) = \mathbb{E}[u^N]$ for all $u \in [0, 1]$. If F admits a density f , G admits a density g with respect to the Lebesgue measure \mathcal{L}_+ defined on \mathbb{R}_+ . Denoting $\dot{M}(u) = \mathbb{E}[Nu^{N-1}]$ for all $u \in [0, 1]$, the density g is given by

$$g(z) = f(z)\dot{M}(1 - F(z)), \quad z \in \mathbb{R}_+. \quad (3.2)$$

We will estimate the distribution F based on a sample of the pile-up distribution G in a parametric setting. The most general setting that will be considered is described in the following assumption that is supposed to hold throughout the chapter.

Assumption 3.1. The *target distribution* F belongs to an identifiable parametric family dominated by \mathcal{L}_+ and is thus described by a collection of densities $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ with parameter set $\Theta \subset \mathbb{R}^d$. The distribution of N is assumed known and given by the probabilities $p(k) = \mathbb{P}(N = k)$ for all $k \in \mathbb{N}^*$. We moreover suppose that $p(1) > 0$.

The requirement $p(1) > 0$ means that the probability to observe the undistorted target distribution f_{θ_0} should not be zero. That means, it should be possible that a sample of pile-up observations contains observations that follow the undistorted target distribution because they are not the minimum of several variables. Note however that N is unobserved, hence we cannot select a sub-sample of the target distribution.

Definition 3.1. Under Assumption 3.1, let us denote by $\{g_\theta, \theta \in \Theta\}$ the corresponding collection of densities obtained by Relation (3.2). We call this model, that is dominated by \mathcal{L}_+ , the *pile-up model* associated with the *target model* $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ and the distribution p of N .

In the remainder of the chapter we adopt the following notation: under the expectation sign \mathbb{E}_θ , Y has target density f_θ and Z has the corresponding pile-up density g_θ . Moreover we denote by F_θ and G_θ the distribution functions associated with these two densities, respectively.

When dealing with fluorescence lifetime measurements, N is assumed to follow a Poisson distribution restricted on \mathbb{N}^* with parameter $\lambda > 0$, see (1.9). It follows that

$$M(u) = (e^{\lambda u} - 1)/(e^\lambda - 1) \quad \text{and} \quad \dot{M}(u) = \lambda e^{\lambda u}/(e^\lambda - 1), \quad u \in [0, 1]. \quad (3.3)$$

Hence the pile-up density writes

$$g_{\theta, \lambda}(z) = \frac{\lambda f_\theta(z) e^{-\lambda F_\theta(z)}}{1 - e^{-\lambda}}, \quad z \in \mathbb{R}_+.$$

Standard target distributions in fluorescence lifetime measurements include the exponential distribution or finite mixtures of exponential distributions, possibly polluted by an additive instrument noise (see O'Connor & Phillips (1984) and Section 1.2).

3.2 ESTIMATION METHOD

In this section we aim at constructing a parameter estimate adapted to the pile-up model. The difficulty of estimation in the pile-up model is due to the involved form of the pile-up density function. Moment estimators or the classical maximum likelihood estimator are in general intractable.

We propose a modification of the maximum likelihood approach that relies on replacing the standard likelihood function with a new likelihood-based contrast, that we shall call the *corrected likelihood* in the following. The new *corrected maximum likelihood estimator* will be defined as a maximizer of the corrected likelihood. The advantage of the corrected likelihood is that its maximization complexity is essentially the same as the likelihood associated with the target distribution. In particular, if the EM algorithm applies to the likelihood of the target distribution, then it applies similarly to the corrected likelihood.

3.2.1 CORRECTED LIKELIHOOD

Consider the log-likelihood associated with an i.i.d. sample (Y_1, \dots, Y_n) from the target distribution F_{θ_0} , namely

$$L_n(\theta) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log(f_{\theta}(Y_i)) . \quad (3.4)$$

Recall that the rationale in using the log-likelihood as a contrast function is that, by the strong law of large numbers, as $n \rightarrow \infty$, $L_n(\theta) - L_n(\theta_0)$ converges to the negated Kullback-Leibler divergence $\mathbb{E}_{\theta_0} [\log(f_{\theta}(Y)/f_{\theta_0}(Y))]$ and thus is asymptotically maximized at $\theta = \theta_0$. Now, from Equation (3.2), we have, for any real-valued function h defined on \mathbb{R}_+ ,

$$\mathbb{E}_{\theta_0} [h(Y)] = \mathbb{E}_{\theta_0} \left[\frac{h(Z)}{M(1 - F_{\theta_0}(Z))} \right] .$$

Since M is strictly increasing on $[0, 1]$ with values in $[0, 1]$, M is invertible and we denote its inverse by M^{-1} . Then Equation (3.1) gives that $1 - F_{\theta_0}(z) = M^{-1}(1 - G_{\theta_0}(z))$. Thus we may rewrite the previous display as

$$\mathbb{E}_{\theta_0} [h(Y)] = \mathbb{E}_{\theta_0} [w \circ G_{\theta_0}(Z) h(Z)] , \quad (3.5)$$

where we defined

$$w(u) = \frac{1}{M \circ M^{-1}(1 - u)} , \quad u \in [0, 1] , \quad (3.6)$$

with the convention that $1/\infty = 0$. Taking $h = \log(f_{\theta})$ in (3.5), we get for a sample (Z_1, \dots, Z_n) from the pile-up distribution G_{θ_0} that

$$\tilde{L}_n(\theta) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w \circ G_{\theta_0}(Z_i) \log f_{\theta}(Z_i) \quad (3.7)$$

has the same property as the one pointed out before for the likelihood L_n . However, (3.7) involves θ_0 , so it cannot be used for parameter estimation. We propose to modify (3.7) by replacing G_{θ_0} with the empirical distribution function $\hat{G}_n(z) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbb{1}\{Z_i \leq z\}$. Then a corrected log-likelihood function which is based on the sample (Z_1, \dots, Z_n) and which reasonably estimates $L_n(\theta)$ in (3.4) is given by

$$\hat{L}_n(\theta) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w \circ \hat{G}_n(Z_i) \log f_\theta(Z_i) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w(i/n) \log f_\theta(Z_{(i,n)}), \quad (3.8)$$

where $Z_{(i,n)}$ denotes the i -th order statistic of the sample (Z_1, \dots, Z_n) satisfying $Z_{(1,n)} \leq Z_{(2,n)} \leq \dots \leq Z_{(n,n)}$. Note that to avoid dividing by 0 in the definition of $\hat{L}_n(\theta)$ it is necessary that $p(1) > 0$ as claimed in Assumption 3.1, otherwise $\dot{M}(0) = 0$. Introducing the nonnegative weights

$$w_{i,n} = w(i/n), \quad i = 1, \dots, n, \quad (3.9)$$

we define a new parameter estimate of θ_0 by

$$\hat{\theta}_n = \arg \max_{\theta \in \Theta} \hat{L}_n(\theta) = \arg \max_{\theta \in \Theta} \sum_{i=1}^n w_{i,n} \log f_\theta(Z_{(i,n)}), \quad (3.10)$$

to which we will refer as the *corrected maximum likelihood estimator* (corrected MLE). The weights $w_{i,n}$ appearing in $\hat{L}_n(\theta)$ are aimed to correct the pile-up effect, namely, the fact that (Z_1, \dots, Z_n) is a sample of the distribution G_{θ_0} instead of F_{θ_0} .

Relation (3.5) can be used more widely for *correcting* any statistical method based on moments of the target distribution that one wishes to apply with pile-up observations. More precisely, define the *corrected empirical distribution* from pile-up observations Z_1, \dots, Z_n

$$\hat{P}_n^c = \frac{1}{n} \sum_i w_{i,n} \delta_{Z_{(i,n)}},$$

where $w_{i,n}$ are the weights given by (3.9) and δ_x is the unit mass at point x . That is, for every function h ,

$$\hat{P}_n^c(h) = \frac{1}{n} \sum_i w_{i,n} h(Z_{(i,n)}). \quad (3.11)$$

As this is a linear combination of transformed order statistics, $\hat{P}_n^c(h)$ is an L -statistic, which is different from the standard empirical distributions defined by

$$\hat{P}_n(h) = \frac{1}{n} \sum_i h(Y_i) \quad \text{and} \quad \tilde{P}_n(h) = \frac{1}{n} \sum_i h(Z_i). \quad (3.12)$$

The following result, which justifies the above approach, relies on the fact that $\hat{P}_n^c(h)$, $\tilde{P}_n(w \circ G \times h)$ and $\hat{P}_n(h)$ have the same limits.

Theorem 3.2. *Suppose that Assumption 3.1 holds. Let Y have distribution F and $(Z_i)_{i \geq 1}$ be an i.i.d. sequence with distribution G . Then, for any real valued function h defined on \mathbb{R}_+ satisfying $\mathbb{E}[|h(Z)|] < \infty$, we have $\hat{P}_n^c(h) \rightarrow \mathbb{E}[h(Y)]$ as $n \rightarrow \infty$ almost surely (a.s.).*

The proof of this result is detailed in Section 3.6, where the proofs of all the results of this chapter are united. This theorem mainly relies on the relation

$$\hat{P}_n^c(h) = \tilde{P}_n(w \circ \hat{G}_n \times h), \quad (3.13)$$

the Glivenko-Cantelli theorem, the strong law of large number and the fact that, under Assumption 3.1, the weights $w_{i,n}$ are bounded.

Theorem 3.2 implies that any consistent moment estimator based on observations of the target distribution remains consistent when the corrected empirical distribution based on the pile-up observations Z_1, \dots, Z_n is used. It also gives that the corrected log-likelihood $\hat{L}_n(\theta)$ is such that $\hat{L}_n(\theta) - \hat{L}_n(\theta_0)$ converges to the Kullback-Leibler divergence of f_{θ_0} with f_θ a.s. This is the basic argument for proving the consistency of $\hat{\theta}_n$ defined by (3.10), see Section 3.3.1.

3.2.2 MAXIMIZATION BY THE EM ALGORITHM

In the special case where the target distribution is exponential, i.e. $f_\theta(y) = \theta e^{-\theta y}$, $\theta > 0$, and N follows the restricted Poisson distribution given in (1.9), it turns out that

$$\hat{\theta}_n = \frac{\sum_{i=1}^n w_{i,n}}{\sum_{i=1}^n w_{i,n} Z_{(i,n)}}.$$

Moreover, using (3.9), (3.3) and $M^{-1}(u) = \log\{u(e^\lambda - 1) + 1\}/\lambda$, the weights are given by

$$w_{i,n} = \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda \left[\frac{i}{n} (e^{-\lambda} - 1) + 1 \right]}, \quad i = 1, \dots, n. \quad (3.14)$$

The last two displays show that the numerical computation of the estimator derived from the corrected likelihood is immediate in this context. This is in sharp contrast with the maximum likelihood estimator associated with the pile-up model defined as the positive number θ maximizing

$$\sum_{i=1}^n \log \left(\sum_{k=1}^{\infty} p_\lambda(k) k \theta e^{-k\theta Z_i} \right).$$

The log argument is the density of the pile-up observations Z_i , $i = 1, \dots, n$, corresponding to the parameter θ . This is easily obtained by observing that the minimum of k r.v.'s distributed according to the exponential density f_θ has density $f_{k\theta}$ and thus the pile-up model is an infinite discrete mixture of exponential densities with a mixing distribution supported on $\{k\theta, k = 1, 2, 3\}$ with probabilities $p_\lambda(k)$. The numerical cost for computing the maximizer of the corrected likelihood estimator is thus obviously lower than for the pile-up likelihood in this case. This feature remains true in a large variety of situations. Indeed, the only difference of the maximization problem given by (3.10) compared to maximizing the likelihood without pile-up (3.4) are the nonnegative weights $w_{i,n}$. This makes the two maximization problems of equivalent cost while the pile-up likelihood maximization is in general much more costly, if tractable at all. A situation of particular interest is when the family of densities $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ is such that the EM algorithm applies to the target model. As we will see, this is the case if the target model is a finite mixture of exponential distributions polluted by an additive noise with known distribution, which is a broadly used model for fluorescence measurements. In this situation, the same algorithm may be applicable to resolve the corrected maximization (3.10). To precise how this works, let us make the following assumption.

Assumption 3.2. Suppose that Assumption 3.1 holds. Let \mathcal{L}_+ be the Lebesgue measure on \mathbb{R}_+ and μ be a measure on a state space \mathcal{X} . Suppose moreover that $\{\pi_\theta, \theta \in \Theta\}$ is a collection of densities with respect to $\mathcal{L}_+ \otimes \mu$, such that, for all $\theta \in \Theta$, $f_\theta = \int \pi_\theta(\cdot, s)\mu(ds)$.

The second component of the distribution π_θ corresponds to the latent variable, say X . Let $q_{\theta, \theta'}(y, x)$ denote the log density of (Y, X) at parameter θ integrated according to the conditional distribution given that $Y = y$ at parameter θ' , namely

$$q_{\theta, \theta'}(y) = \mathbb{E}_{\theta'}[\log \pi_\theta(Y, X) \mid Y = y] = \int_{x \in \mathcal{X}} \log \pi_\theta(y, x) \frac{\pi_{\theta'}(y, x)}{f_{\theta'}(y)} \mu(dx) .$$

Having in mind the same approach as above for the corrected likelihood, we define in analogy to the standard EM algorithm, for all $\theta, \theta' \in \Theta$,

$$Q(\theta, \theta'; Z_1, \dots, Z_n) = \sum_{i=1}^n w_{i,n} q_{\theta, \theta'}(Z_{(i,n)})$$

Now, as for the standard EM algorithm, we define the sequence $(\theta^{(t)})_{t \geq 0}$ for any starting value $\theta^{(0)} \in \Theta$ in the following recurrent way, for all $t \in \mathbb{N}$,

$$\theta^{(t+1)} = \arg \max_{\theta \in \Theta} Q(\theta, \theta^{(t)}; Z_1, \dots, Z_n) . \quad (3.15)$$

The sequence $(\theta^{(t)})_{t \geq 0}$ has the same properties as a sequence obtained by the standard EM algorithm. Namely, at each iteration the value of the log-likelihood $\hat{L}_n(\theta^{(t)})$ increases, and in addition, the sequence $(\theta^{(t)})_{t \geq 0}$ tends to a critical point of the corrected log-likelihood function $\hat{L}_n(\theta)$.

Theorem 3.3. *The sequence $(\theta^{(t)})_{t \geq 0}$ defined by (3.15) satisfies for all $t \geq 0$,*

$$\hat{L}_n(\theta^{(t+1)}) \geq \hat{L}_n(\theta^{(t)}) . \quad (3.16)$$

Furthermore, if $(\theta^{(t)})_{t \geq 0}$ converges to some θ^ in the closure of Θ and if for all t*

$$\nabla_\theta Q(\theta, \theta^{(t)}; Z_1, \dots, Z_n)|_{\theta=\theta^{(t+1)}} = 0 ,$$

then θ^ is a critical point of $\hat{L}_n(\theta)$, i.e.*

$$\nabla_\theta \hat{L}_n(\theta)|_{\theta=\theta^*} = 0 .$$

Theorem 1 and 4 in Dempster *et al.* (1977) correspond to the case where $w_{i,n} \equiv 1$. Using that $w_{i,n}$ are non negative numbers, the arguments provided in Dempster *et al.* (1977) continue to hold.

3.3 ASYMPTOTIC BEHAVIOR

In this section we study the asymptotic behavior of the corrected MLE $\hat{\theta}_n$ obtained by maximizing the corrected likelihood, see (3.10). We show its consistency and determine its limit distribution. To this end we use that the corrected likelihood function $\hat{L}_n(\theta)$ is an *L-statistic*, that is a linear combination of order statistics.

3.3.1 CONSISTENCY

Recall that the process \tilde{L}_n defined by (3.7) cannot be used in practice for estimation because it depends on the unknown parameters θ_0 . On the other hand, it is a standard empirical mean of the i.i.d. observations Z_1, \dots, Z_n and thus the standard theory for proving the consistency of M -estimators (see e.g. van der Vaart (1998)) can be applied. This theory says that, under standard conditions, the following assumption holds.

Assumption 3.3. For any random sequence $(t_n)_n$ valued in Θ and such that

$$\tilde{L}_n(t_n) \geq \sup_t \tilde{L}_n(t) + o_P(1), \quad (3.17)$$

it follows that $t_n \xrightarrow{P} \theta_0$.

For instance using van der Vaart (1998, Theorem 5.7), Assumption 3.3 holds if

- (3.3-i) the collection of functions $\mathcal{F} = \{w \circ G_{\theta_0} \log(f_{\theta}/f_{\theta_0}), \theta \in \Theta\}$ is a G_{θ_0} -Glivenko-Cantelli class;
- (3.3-ii) for all $\varepsilon > 0$, $\inf_{|\theta - \theta_0| > \varepsilon} \text{KL}(f_{\theta_0} \| f_{\theta}) > 0$, where $\text{KL}(f \| g) = \int \log \frac{f(x)}{g(x)} f(x) dx$ denotes the Kullback-Leibler divergence of two densities f and g .

The Kullback-Leibler divergence $\text{KL}(f_{\theta_0} \| f_{\theta})$ appears here as a consequence of (3.5).

Theorem 3.4. Suppose that Assumptions 3.1 and 3.3 hold and that

$$\sup_{\theta \in \Theta} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \log \frac{f_{\theta}(Z_i)}{f_{\theta_0}(Z_i)} \right| = O_P(1). \quad (3.18)$$

Then any random sequence $(\hat{\theta}_n)$ satisfying

$$\hat{L}_n(\hat{\theta}_n) \geq \sup_{\theta \in \Theta} \hat{L}_n(\theta) + o_P(1)$$

is consistent for θ_0 , i.e. $\hat{\theta}_n \xrightarrow{P} \theta_0$.

The following corollary provides a simple condition implying the general ones of Theorem 3.4.

Corollary 3.5. Suppose that Assumption 3.1 holds, that Θ is a compact subset of \mathbb{R}^d and that there exists a nonnegative function K defined on \mathbb{R}_+ such that $\mathbb{E}_{\theta_0}[K(Z)] < \infty$ and

$$|\log f_{\theta}(z) - \log f_{\theta'}(z)| \leq K(z) \|\theta - \theta'\|, \quad \theta, \theta' \in \Theta, z \in \mathbb{R}_+. \quad (3.19)$$

Then the conclusion of Theorem 3.4 holds.

Examples

In all specific cases that are relevant for the fluorescence lifetime application the corrected MLE is consistent as the following examples show.

Exponential target distribution. Let us consider the case of an exponential target density

$$f_\theta(x) = \theta e^{-\theta x} ,$$

with $\theta \in \Theta = (a, b)$ and $0 < a < b < \infty$ and where N has Poisson distribution restricted on \mathbb{N}^* as defined in (1.9). The conditions (3.18), (3.3-i) and (3.3-ii) implying consistency are easily verified. Namely, Assumption (3.18) holds because $\log \frac{f_\theta(z)}{f_{\theta_0}(z)} = \log \frac{\theta}{\theta_0} + (\theta_0 - \theta)z$ and Θ is bounded. Further, $\text{KL}(f_{\theta_0} \| f_\theta) = \log \frac{\theta_0}{\theta} - 1 + \frac{\theta}{\theta_0}$. As $x \mapsto \log x - 1 + \frac{1}{x}$ attains its minimum at $x = 1$, which equals 0, it follows that condition (3.3-ii) holds. Finally, the class \mathcal{F} in (3.3-i), which is the class of functions $s_\theta(z) = w \circ G_{\theta_0}(z)(\log \frac{\theta}{\theta_0} + (\theta_0 - \theta)z)$ indexed by $\theta \in \Theta$, is G_{θ_0} -Glivenko-Cantelli since w is bounded and Θ is bounded. Then Theorem 3.4 implies that the corrected MLE $\hat{\theta}_n$ is a consistent estimator of θ_0 .

Multi-exponential target distribution. Let the target density f_θ be the multi-exponential defined as

$$\sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k y} . \quad (3.20)$$

We can use a parsimonious parametrization where α_K is given by $1 - \sum_{k=1}^{K-1} \alpha_k$. Let the parameter space Θ be defined by

$$\Theta = \left\{ \theta = (\alpha_1, \dots, \alpha_{K-1}, \nu_1, \dots, \nu_K)^T : \nu_k \in (a, b), \alpha_k \in (\delta, 1), \sum_{k=1}^{K-1} \alpha_k \leq 1 - \delta \right\} ,$$

where $0 < a < b < \infty$ and $\delta > 0$. In Subsection 1.5.1 the identifiability of exponential mixtures is asserted. Thus, Assumption 3.1 holds. Furthermore, for all $z > 0$ and for all $\theta_1 < \theta_2 \in \Theta$, there exists some $\tilde{\theta} \in [\theta_1, \theta_2]$ such that

$$\log f_{\theta_1}(z) - \log f_{\theta_2}(z) = \frac{\nabla f_{\tilde{\theta}}(z)}{f_{\tilde{\theta}}(z)} (\theta_2 - \theta_1) , \quad (3.21)$$

where $\nabla f_{\tilde{\theta}}(z)$ denotes the gradient of $\theta \mapsto f_\theta(z)$ at $\tilde{\theta}$. More precisely,

$$\begin{aligned} \nabla f_\theta(z) &= \left(\frac{\partial f_\theta}{\partial \alpha_1}(z), \dots, \frac{\partial f_\theta}{\partial \alpha_K}(z), \frac{\partial f_\theta}{\partial \nu_1}(z), \dots, \frac{\partial f_\theta}{\partial \nu_K}(z) \right) \\ &= (\nu_1 e^{-\nu_1 z} - \nu_K e^{-\nu_K z}, \dots, \nu_{K-1} e^{-\nu_{K-1} z} - \nu_K e^{-\nu_K z}, \dots, \\ &\quad \alpha_1(1 - \nu_1 z) e^{-\nu_1 z}, \dots, \alpha_K(1 - \nu_K z) e^{-\nu_K z}) . \end{aligned}$$

Because $\alpha_k \geq \delta$ and $\nu_k \in [a, b]$ for all k , we obtain

$$\begin{aligned} \left| \frac{\frac{\partial f_\theta}{\partial \alpha_j}(z)}{f_\theta(z)} \right| &\leq \frac{|\nu_j e^{-\nu_j z} - \nu_K e^{-\nu_K z}|}{\sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k z}} \leq \frac{1}{\alpha_j} + \frac{1}{\alpha_K} \leq \frac{2}{\delta} , \\ \left| \frac{\frac{\partial f_\theta}{\partial \nu_j}(z)}{f_\theta(z)} \right| &\leq \frac{\alpha_j |1 - \nu_j z| e^{-\nu_j z}}{\sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k z}} \leq \frac{|1 - \nu_j z|}{\nu_j} \leq \frac{1 + bz}{a} . \end{aligned}$$

Hence,

$$|\log f_{\theta_1}(z) - \log f_{\theta_2}(z)| \leq \left(\frac{2}{\delta} \wedge \frac{1 + bz}{a} \right) \|\theta_2 - \theta_1\|_\infty .$$

That is, Corollary 3.5 applies with function $K(z) = \frac{2}{\delta} \wedge \frac{1 + bz}{a}$, and hence the corrected MLE is consistent.

Multi-exponential target distribution polluted by additive noise. Denote by η the probability density of the instrument response function. Consider the convolution of η and the multi-exponential density given by (3.20). The target density is then given by

$$f_\theta(z) = \eta * \sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k \cdot} (z) = \sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k z} \int_0^z \eta(u) e^{\nu_k u} du .$$

We can proceed as in the multi-exponential case, since the same Relation (3.21) holds. Now the entries of the gradient $\nabla f_\theta(z)$ are given by

$$\frac{\partial f_\theta}{\partial \alpha_j} = \nu_j e^{-\nu_j z} \int_0^z \eta(u) e^{\nu_j u} du - \nu_K e^{-\nu_K z} \int_0^z \eta(u) e^{\nu_K u} du$$

and

$$\frac{\partial f_\theta}{\partial \nu_j} = \alpha_j \int_0^z \eta(u) e^{\nu_j(u-z)} (1 - \nu_j(u-z)) du .$$

It follows that

$$\begin{aligned} \left| \frac{\frac{\partial f_\theta}{\partial \alpha_j}(z)}{f_\theta(z)} \right| &\leq \frac{\nu_j e^{-\nu_j z} \int_0^z \eta(u) e^{\nu_j u} du - \nu_K e^{-\nu_K z} \int_0^z \eta(u) e^{\nu_K u} du}{\sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k z} \int_0^z \eta(u) e^{\nu_k u} du} \leq \frac{1}{\alpha_j} + \frac{1}{\alpha_K} \leq \frac{2}{\delta} , \\ \left| \frac{\frac{\partial f_\theta}{\partial \nu_j}(z)}{f_\theta(z)} \right| &\leq \frac{\alpha_j \int_0^z \eta(u) e^{\nu_j(u-z)} |1 - \nu_j(u-z)| du}{\sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k z} \int_0^z \eta(u) e^{\nu_k u} du} \leq \frac{1 + \nu_j z}{\nu_j} \leq \frac{1 + bz}{a} . \end{aligned}$$

Hence, by the same arguments as in the multi-exponential case we derive the consistency of the corrected MLE.

3.3.2 LIMIT DISTRIBUTION

We now investigate conditions for the asymptotic normality of the estimator $\hat{\theta}_n$. Therefore, we refer to the central limit theorem for M -estimators of Pollard (1985). We show that a similar central limit theorem holds for M -estimators maximizing an L -statistic and apply this result to the estimator $\hat{\theta}_n$.

We consider a contrast process defined as the L -statistic

$$M_n(t) = \hat{P}_n^c(h(\cdot, t)) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w_{i,n} h(Z_{(i,n)}, t) ,$$

with $h(z, t)$ defined on $\mathbb{R}_+ \times \Theta$. If $h(\cdot, t) = \log f_t$ (or, equivalently $h(\cdot, t) = \log(f_t/f_{\theta_0})$), then $M_n(t)$ is the corrected likelihood (3.8). Denote

$$M(t) = \mathbb{E}_{\theta_0}[h(Y, t)] .$$

where θ_0 is the true parameter. Furthermore, the *corrected* empirical process corresponding to \hat{P}_n^c is defined, for a function k on \mathbb{R}_+ , as

$$\nu_n^c k = \sqrt{n} \left(\hat{P}_n^c(k) - \mathbb{E}_{\theta_0}[k(Y)] \right) . \quad (3.22)$$

We have $\nu_n^c h(\cdot, t) = \sqrt{n}(M_n(t) - M(t))$.

Following Pollard (1985), the following result holds.

Theorem 3.6. *Suppose that the following assertions are true.*

- (i) θ_0 is an interior point of $\Theta \subset \mathbb{R}^d$;
- (ii) $t \mapsto M(t)$ has a nonsingular second derivative $-J \equiv \nabla_t^2 M(\theta_0)$ at its maximizing value θ_0 ;
- (iii) Let θ_n be such that M_n achieves its maximum at θ_n and $(\theta_n)_n$ converges in probability to θ_0 ;

Furthermore, suppose that there exist a real-valued function r and a function Δ taking its values in \mathbb{R}^d such that

- (iv) the following expansion holds for all $z \in \mathbb{R}_+$ and $t \in \Theta$,

$$h(z, t) = h(z, \theta_0) + (t - \theta_0)^T \Delta(z) + |t - \theta_0| r(z, t), \quad (3.23)$$

- (v) there exists a covariance matrix Σ such that the following convergence holds: $\nu_n^c \Delta \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \Sigma)$;
- (vi) for any sequence of balls U_n that shrinks to θ_0 as $n \rightarrow \infty$, we have

$$\sup_{t \in U_n} \frac{|\nu_n^c r(\cdot, t)|}{1 + \sqrt{n}|t - \theta_0|} \xrightarrow{P} 0. \quad (3.24)$$

Then, we have

$$\sqrt{n}(\theta_n - \theta_0) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, J^{-1} \Sigma J^{-1}).$$

This result is easily obtained by adapting the proof of Theorem 2 in Pollard (1985) in the following way.

1. The standard empirical process ν_n defined by

$$\nu_n k = \sqrt{n} \left(\sum_{i=1}^n k(Y_i) - \mathbb{E}_{\theta_0}[k(Y)] \right)$$

is replaced by the corrected empirical process ν_n^c defined above.

2. The conditions $\mathbb{E}_{\theta_0}[|\Delta(Y)|^2] < \infty$ and $\mathbb{E}_{\theta_0}[\Delta(Y)] = 0$ are replaced by (v).

These adaptations yield the two unusual conditions (v) and (vi). To verify Condition (v) central limit theorems for L -statistics can be used, see e.g. Shorack (2000); van der Vaart (1998) or Corollary 3.9, which is proven in the Appendix B. Condition (vi) is similar to the so called *stochastic differentiability* condition in Pollard (1985) except that the empirical process ν_n is replaced by ν_n^c which is based on an L -statistic. However, the following lemma shows that a standard empirical process can be used to verify this condition. Let $\tilde{\nu}_n$ denote the standard empirical process associated with the i.i.d. sequence (Z_k) ,

$$\tilde{\nu}_n k = \sqrt{n} \left(\tilde{P}_n(k) - \mathbb{E}_{\theta_0}[k(Z)] \right),$$

where \tilde{P}_n is defined in (3.12).

Lemma 3.7. *Suppose that w is Lipschitz continuous on $[0, 1]$, that is, there exists $L > 0$ such that*

$$|w(u) - w(v)| \leq L |u - v|, \quad \text{for all } u, v \in [0, 1].$$

Define ν_n^c by (3.22). If for any sequence of balls U_n that shrinks to θ_0 as $n \rightarrow \infty$, we have

$$\sup_{t \in U_n} \tilde{P}_n |r(\cdot, t)| \xrightarrow{P} 0, \quad (3.25)$$

$$\text{and} \quad \sup_{t \in U_n} \frac{|\tilde{\nu}_n(w \circ G \times r(\cdot, t))|}{1 + \sqrt{n}|t - \theta_0|} \xrightarrow{P} 0, \quad (3.26)$$

then Condition (vi) holds.

In most cases, a smoothness condition on $t \mapsto h(z, t)$ holds with some uniformity in z , in which case the Condition (vi) follows. Such a smoothness condition is detailed in the following lemma.

Lemma 3.8. *Suppose that w is Lipschitz continuous on $[0, 1]$ and that for all $z \in \mathbb{R}_+$, $h(z, \cdot)$ is continuously differentiable in Θ with derivative denoted by $\dot{h}(z, \cdot)$. Assume moreover that there exists K defined on \mathbb{R}_+ and a neighborhood U of θ_0 such that, for all $t \in U$,*

$$\left| \dot{h}(z, t) - \dot{h}(z, \theta_0) \right| \leq K(z) |t - \theta_0|, \quad (3.27)$$

$$\text{and} \quad \mathbb{E} [K^2(Z)] < \infty. \quad (3.28)$$

Then Condition (vi) holds for r defined by (3.23) with $\Delta(z) = \dot{h}(z, \theta_0)$.

To verify Condition (v) the following central limit theorem for L -statistics can be used. For a detailed derivation of this result we refer to Appendix B.

Lemma 3.9. *Suppose that Assumption 3.1 holds. Let k be continuous, of bounded variation on bounded intervals. Furthermore, suppose that $\mathbb{E}[|k(Z)|] < \infty$ and $\mathbb{E}[(w \circ G(Z)k(Z))^2] < \infty$ and $\sigma^2(|k|) < \infty$, where $\sigma^2(\cdot)$ is defined in (3.29). If, further $\mathbb{E}[N^2] < \infty$, then*

$$\nu_n^c k \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \sigma^2(k)),$$

where

$$\begin{aligned} \sigma^2(k) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} w \circ G_{\theta_0}(s) w \circ G_{\theta_0}(t) \{G_{\theta_0}(s \wedge t) - G_{\theta_0}(s)G_{\theta_0}(t)\} dk(s) dk(t) \\ &= \mathbb{E} \left[(w \circ G_{\theta_0}(Z))^2 k^2(Z) \right] + 2\mathbb{E} \left[w'_1 \circ G_{\theta_0}(Z_1) w'_2 \circ G_{\theta_0}(Z_2) k(Z_1) k(Z_2) \mathbb{1}\{Z_1 > Z_2\} \right], \end{aligned} \quad (3.29)$$

with $w_1(x) = (1 - x)w(x)$ and $w_2(x) = xw(x)$. If the above conditions hold for every function k_1, \dots, k_m , then a multi-dimensional central limit theorem holds. Denote $\mathbf{k} = (k_1, \dots, k_m)^T$. Then $\nu_n^c(\mathbf{k}) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \Sigma(\mathbf{k}))$ where $\Sigma(\mathbf{k}) = (\sigma^2(k_i, k_j))$ and

$$\begin{aligned} \sigma^2(k_i, k_j) &= \mathbb{E}[(w \circ G_{\theta_0}(Z))^2 k_i(Z) k_j(Z)] \\ &\quad + 2\mathbb{E}[w'_1 \circ G_{\theta_0}(Z_1) w'_2 \circ G_{\theta_0}(Z_2) k_i(Z_1) k_j(Z_2) \mathbb{1}\{Z_1 > Z_2\}]. \end{aligned} \quad (3.30)$$

The following corollary sums up sufficient conditions for the corrected MLE to have an asymptotic normal distribution.

Corollary 3.10. *Suppose that Assumption 3.1 and Condition (i),(ii) and (iii) of Theorem 3.6 hold. Suppose that $h(z, \cdot) = \log f_\theta(z)$ is continuously differentiable in Θ with derivative denoted by $\dot{h}(z, \cdot)$ and (3.27) and (3.28) are satisfied. Assume that $\mathbb{E}[N^2] < \infty$, $\mathbb{E}[|\dot{h}(Z, \theta_0)|] < \infty$, $\mathbb{E}[(w \circ G(Z)\dot{h}(Z, \theta_0))^2] < \infty$ and $\sigma^2(|\dot{h}(\cdot, \theta_0)|) < \infty$ hold. Then the corrected MLE $\hat{\theta}_n$ satisfies*

$$\sqrt{n}(\hat{\theta}_n - \theta_0) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, J^{-1}\Sigma J^{-1}) ,$$

where $\Sigma = \Sigma^2(\dot{h}(\cdot, \theta_0))$ is defined in (3.30).

Examples

Exponential target distribution. In the exponential case we have already shown that Condition (iii) holds if $\Theta = (a, b)$ with $0 < a < b < \infty$. Further, $M(\theta) = \mathbb{E}_{\theta_0}[\log f_\theta(Y)] = \log \theta - \frac{\theta}{\theta_0}$, thus (ii) holds with $J = \theta^{-2} > 0$. In addition, $h(z, t) = \log t - tz$ is continuously differentiable with $\dot{h}(z, \theta_0) = \frac{1}{\theta_0} - z$ and $\mathbb{E}[\dot{h}^2(Z, \theta_0)] < \infty$. As $\Theta = (a, b)$ with $a > 0$, (3.27) holds with some constant function K , which implies (3.28). According to Lemma 3.9, the limit variance of $\nu_n^c \dot{h}(\cdot, \theta_0)$ is given by

$$\begin{aligned} \sigma^2(\dot{h}(\cdot, \theta_0)) &= 2 \int_0^\infty \int_t^\infty w \circ G(t)w \circ G(s)G(t)(1 - G(s)) d\Delta(s) d\Delta(t) \\ &= \frac{2}{\lambda} \int_0^\infty w \circ G(t)G(t) \int_t^\infty 1 - \exp\{-\lambda e^{\theta_0 s}\} ds dt \\ &= -\frac{2}{\lambda} \int_0^\infty w \circ G(t)G(t) \sum_{n=1}^\infty \frac{(-\lambda)^n}{n!} \int_t^\infty e^{-n\theta_0 s} ds dt \\ &= -\frac{2e^\lambda}{\theta_0 \lambda^2} \sum_{n=1}^\infty \frac{(-\lambda)^n}{n!n} \left\{ \sum_{m=0}^\infty \frac{(-\lambda)^m}{m!} \int_0^\infty e^{-(n+m)\theta_0 t} dt - e^{-\lambda} \int_0^\infty e^{-n\theta_0 t} dt \right\} \\ &= \frac{1}{\theta_0^2} \left\{ \frac{2}{\lambda^2} \sum_{n=1}^\infty \frac{(-\lambda)^n}{n!n^2} - e^\lambda \sum_{n=1}^\infty \frac{(-\lambda)^n}{n!n} \sum_{m=0}^\infty \frac{(-\lambda)^m}{m!(m+n)} \right\} . \end{aligned} \quad (3.31)$$

Denote the term in braces by τ . Then Corollary 3.10 yields the asymptotic normality of the corrected MLE $\hat{\theta}_n$, namely

$$\sqrt{n}(\hat{\theta}_n - \theta_0) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \theta_0^2 \tau) . \quad (3.32)$$

See Subsection 3.4.3 for a visualization of the limit variance and a comparison with the Cramér-Rao bound.

Multi-exponential target distribution. Use the parsimonious parametrization of the multi-exponential density where α_K is determined by the values of $\alpha_1, \dots, \alpha_{K-1}$. That is, the multi-exponential density is written as

$$f_\theta(y) = \sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k y} = \sum_{k=1}^{K-1} \alpha_k (\nu_k e^{-\nu_k y} - \nu_K e^{-\nu_K y}) + \nu_K e^{-\nu_K y} .$$

The partial derivatives of $\theta \mapsto h(z, \theta) = \log f_\theta(z)$ are

$$\frac{\partial h(z, \theta)}{\partial \nu_k} = \frac{\alpha_k (1 - \nu_k z) e^{-\nu_k z}}{f_\theta(z)} \quad \text{and} \quad \frac{\partial h(z, \theta)}{\partial \alpha_k} = \frac{\nu_k e^{-\nu_k z} - \nu_K e^{-\nu_K z}}{f_\theta(z)} .$$

We denote the gradient by $\dot{h}(z, \theta) = \left[\frac{\partial h(z, \theta)}{\partial \nu_1}, \dots, \frac{\partial h(z, \theta)}{\partial \nu_K}, \frac{\partial h(z, \theta)}{\partial \alpha_1}, \dots, \frac{\partial h(z, \theta)}{\partial \alpha_{K-1}} \right]$. By similar arguments as in the derivation of the consistency one can show that Condition (3.27) and (3.28) are verified. The other conditions of Corollary 3.10 are also easily verified. Note that the parsimonious parametrization is necessary to obtain $\nabla M(\theta_0) = 0$ and thus that θ_0 is a point of maximum of M (see Condition (ii) of Theorem 3.6). It follows that the corrected MLE $\hat{\theta}_n$ has asymptotic normal distribution.

We now compute the limit variance of the corrected MLE. Let $M(\theta) = \mathbb{E}_{\theta_0}[\log f_{\theta}(Y)]$ as above and denote the gradient of $\theta \mapsto f_{\theta}(y)$ by $\dot{f}_{\theta}(y)$. By differentiation under the integral sign we obtain

$$J = -\nabla^2 M(\theta_0) = \mathbb{E}_{\theta_0} \left[\frac{\dot{f}_{\theta_0}^T(Y) \dot{f}_{\theta_0}(Y)}{(f_{\theta_0}(Y))^2} \right] = \int_0^{\infty} \frac{\dot{f}_{\theta_0}^T(y) \dot{f}_{\theta_0}(y)}{f_{\theta_0}(y)} dy.$$

As N has Poisson distribution restricted on \mathbb{N}^* , we have

$$\begin{aligned} w \circ G_{\theta_0}(z) &= \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda} e^{\lambda F_{\theta_0}(z)} \quad \text{and} \quad w' \circ G_{\theta_0}(z) = \lambda(w \circ G_{\theta_0}(z))^2 \\ w'_1 \circ G_{\theta_0}(z) &= -e^{-\lambda} e^{\lambda F_{\theta_0}(z)} w \circ G_{\theta_0}(z) \quad \text{and} \quad w'_2 \circ G_{\theta_0}(z) = e^{\lambda F_{\theta_0}(z)} w \circ G_{\theta_0}(z). \end{aligned}$$

By Relation (3.5) the variance defined in (3.30) simplifies to

$$\begin{aligned} \sigma^2(k_i, k_j) &= \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda} \mathbb{E}_{\theta_0} [e^{\lambda F_{\theta_0}(Y)} k_i(Y) k_j(Y)] \\ &\quad - 2e^{-\lambda} \mathbb{E}_{\theta_0} [e^{\lambda F_{\theta_0}(Y_1) + \lambda F_{\theta_0}(Y_2)} k_i(Y_1) k_j(Y_2) \mathbb{1}\{Z_1 > Z_2\}]. \end{aligned}$$

Hence, formally

$$\begin{aligned} \Sigma &= \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda} \mathbb{E}_{\theta_0} [e^{\lambda F_{\theta_0}(Y)} \dot{h}(Y, \theta_0)^T \dot{h}(Y, \theta_0)] \\ &\quad - 2e^{-\lambda} \mathbb{E}_{\theta_0} [e^{\lambda F_{\theta_0}(Y_1) + \lambda F_{\theta_0}(Y_2)} \dot{h}(Y_1, \theta_0)^T \dot{h}(Y_2, \theta_0) \mathbb{1}\{Z_1 > Z_2\}] \\ &= \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda} \int_0^{\infty} e^{\lambda F_{\theta_0}(y)} \frac{\dot{f}_{\theta_0}^T(y) \dot{f}_{\theta_0}(y)}{f_{\theta_0}(y)} dy \\ &\quad - 2e^{-\lambda} \int_0^{\infty} \int_{y_2}^{\infty} e^{\lambda F_{\theta_0}(y_1) + \lambda F_{\theta_0}(y_2)} \dot{f}_{\theta_0}^T(y_1) \dot{f}_{\theta_0}(y_2) dy_1 dy_2. \end{aligned}$$

Numerical integration may be used to compute the above integrals. According to Corollary 3.10 we have

$$\sqrt{n}(\hat{\theta}_n - \theta_0) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, J^{-1} \Sigma J^{-1}), \quad (3.33)$$

with J and Σ as defined above.

3.4 EVALUATION OF THE PERFORMANCE OF THE CORRECTED MLE

In this section the performance of the corrected MLE is assessed by application on real and synthetic data. It is shown that the estimator is well-suited for fluorescence lifetime measurements, as the additive noise can be easily included in the target model and accurate parameter estimates

are obtained by the EM algorithm. Furthermore, in comparison to methods typically used in practice, the variance of the corrected MLE is significantly smaller. It is shown that the corrected MLE attains the Cramér-Rao bound for a large range of values of the intensity λ . In addition, the influence of technical constraints on the corrected MLE is investigated, namely the histogram form of the data or the cutoff effect, that is right-censored observations.

3.4.1 EM ALGORITHM IN THE TCSPC CONTEXT

A realistic target model for fluorescence lifetime measurements is a multi-exponential distribution polluted with additive noise. More precisely, denote by η the instrument response function, that is the density function associated with the noise added by the instrument on the fluorescence lifetime. Let $\{A_i, i \geq 1\}$ and $\{X_i, i \geq 1\}$ be two independent sequences of i.i.d. random variables with density η and multi-exponential density given in (3.20), respectively. The arrival time of a fluorescence photon (without pile-up effect) is defined by $Y_i = X_i + A_i$, where X_i represent the fluorescence lifetime of the i -th photon and A_i an additional duration originated from the instrumentation. Thus the density f_θ of Y_i is the convolution

$$f_\theta(y) = \int_0^y \eta(y-u) \sum_{k=1}^K \alpha_k \nu_k e^{-\nu_k u} du. \quad (3.34)$$

In Subsection 3.3.1 it is shown that the corrected MLE is consistent for this target model and Poisson distribution restricted on \mathbb{N}^* of the number N of photons per excitation cycle.

For the EM algorithm we consider the two latent variables (S, A) for the observation $Y = X + A$, where S is the label of the exponential component that has generated X , and A is the noise coming from the instrument response function η . The joint density of (Y, S, A) is given by

$$\pi_\theta(y, s, a) = \eta(a) \alpha_s \nu_s e^{-\nu_s(y-a)}, \quad 0 < a < y, \quad s = 1, \dots, K.$$

The E-step consists in computing

$$Q(\theta, \theta'; Z_1, \dots, Z_n) = \sum_{i=1}^n w_{i,n} \mathbb{E}_{\theta'} [\log \pi_\theta(Z_{(i,n)}, S, A) \mid Y = Z_{(i,n)}].$$

We observe that the maximization $\theta^{(t+1)} = \arg \max_{\theta \in \Theta} Q(\theta, \theta^{(t)}; Z_1, \dots, Z_n)$ breaks up into two independent maximization problems

$$\begin{aligned} (\alpha_1^{(t+1)}, \dots, \alpha_K^{(t+1)}) &= \arg \max_{\sum \alpha_k = 1} \sum_{i=1}^n w_{i,n} \mathbb{E}_{\theta^{(t)}} [\log \alpha_S \mid Y = Z_{(i,n)}], \\ (\nu_1^{(t+1)}, \dots, \nu_K^{(t+1)}) &= \arg \max_{\nu_k > 0} \sum_{i=1}^n w_{i,n} \{ \mathbb{E}_{\theta^{(t)}} [\log \nu_S - \nu_S Z_{(i,n)} \mid Y = Z_{(i,n)}] + \mathbb{E}_{\theta^{(t)}} [\nu_S A \mid Y = Z_{(i,n)}] \}, \end{aligned}$$

with solutions given by

$$\begin{aligned} \alpha_l^{(t+1)} &= \frac{\sum_{i=1}^n w_{i,n} \mathbb{P}_{\theta^{(t)}}(S = l \mid Y = Z_{(i,n)})}{\sum_{i=1}^n w_{i,n}}, \\ \nu_l^{(t+1)} &= \frac{\sum_{i=1}^n w_{i,n} \mathbb{P}_{\theta^{(t)}}(S = l \mid Y = Z_{(i,n)})}{\sum_{i=1}^n w_{i,n} \mathbb{P}_{\theta^{(t)}}(S = l \mid Y = Z_{(i,n)}) \{ Z_{(i,n)} - \mathbb{E}_{\theta^{(t)}}[A \mid Y = Z_{(i,n)}, S = l] \}}. \end{aligned}$$

It remains to evaluate $\mathbb{P}_{\theta'}(S = l \mid Y = Z_{(i,n)})$ and $\mathbb{E}_{\theta'}[E \mid Y = Z_{(i,n)}, S = l]$. We have

$$\begin{aligned}\mathbb{P}_{\theta'}(S = l \mid Y = z) &= \frac{\alpha'_l \nu'_l e^{-\nu'_l z} \int_0^z \eta(x) e^{\nu'_l x} dx}{\sum_{k=1}^K \alpha'_k \nu'_k e^{-\nu'_k z} \int_0^z \eta(x) e^{\nu'_k x} dx}, \\ \mathbb{E}_{\theta'}[A \mid Y = z, S = l] &= \frac{\int_0^z x \eta(x) e^{\nu'_l x} dx}{\int_0^z \eta(x) e^{\nu'_l x} dx}.\end{aligned}\tag{3.35}$$

Further evaluations depend on the function η . In the TCSPC-set up the instrument response function is typically known by a histogram. Hence, we can assume that η is a step function of the form

$$\eta(a) = \sum_{j=1}^R r_j \mathbb{1}\{h_{j-1} \leq a < h_j\},\tag{3.36}$$

where r_j are non negative constants and the h_j are a subdivision of the (finite) support of η (with $h_{j-1} < h_j$) satisfying $\sum_{j=1}^R r_j (h_j - h_{j-1}) = 1$. Then the integrals in (3.35) are given by the following sums

$$\begin{aligned}\int_0^z \eta(x) e^{\nu x} dx &= \frac{1}{\nu} \sum_{j=1}^R \mathbb{1}\{z < h_j\} r_j \left[e^{\nu(h_j \wedge z)} - e^{\nu h_{j-1}} \right], \\ \int_0^z x \eta(x) e^{\nu x} dx &= \frac{1}{\nu} \sum_{j=1}^R \mathbb{1}\{z < h_j\} r_j \left[(h_j \wedge z) e^{\nu(h_j \wedge z)} - h_{j-1} e^{\nu h_{j-1}} \right] - \frac{1}{\nu} \int_0^z \eta(x) e^{\nu x} dx.\end{aligned}$$

Remark that in the fluorescence application one is more interested in the lifetime constants $\tau_k = 1/\nu_k$ than in the values of ν_k . It is straightforward to apply the EM-algorithm directly on the reparametrized model with $\tau_k = 1/\nu_k$.

3.4.2 APPLICATION TO FLUORESCENCE MEASUREMENTS

We apply the corrected MLE to real TCSPC measurements. Figure 3.1 shows the histogram of photon arrival times and the instrument response function η of the measuring instrument. Data were obtained at a laser intensity corresponding to $\lambda = 0.166$. Hence, about 8% of the arrival times are the minimum of two or more photons. Consequently, the pile-up effect is not negligible. The sample size is $n = 1,743,811$ and there is a single-exponential component, $K = 1$. In this experiment the lifetime constant of the molecule is known to be $\tau = 1/\nu = 2.54$ ns. For more details on the data we refer to Patting *et al.* (2007).

An estimator of the exponential parameter that does not take into account the pile-up effect yields the value $\tilde{\tau} = 2.40$ ns which is significantly shorter than the expected value. Applying the corrected MLE of the preceding paragraph provides the estimated value $\hat{\tau} = 2.5393$ ns. Figure 3.2 shows that the estimated pile-up density $g_{\hat{\theta}_n}$ is close to the (normalized) TCSPC data. We draw the conclusion that the corrected MLE is well adapted to the pile-up model and handles additive noise correctly.

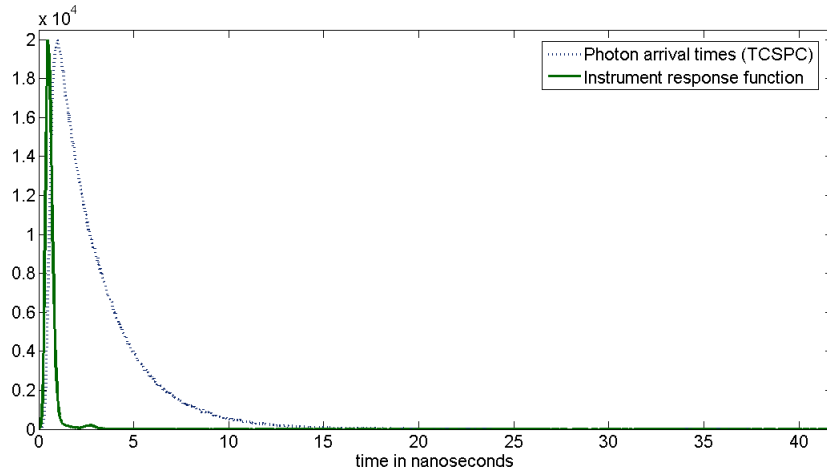


Figure 3.1: TCSPC measurements and instrument response function η of a single-exponential component with $\lambda = 0.166$.

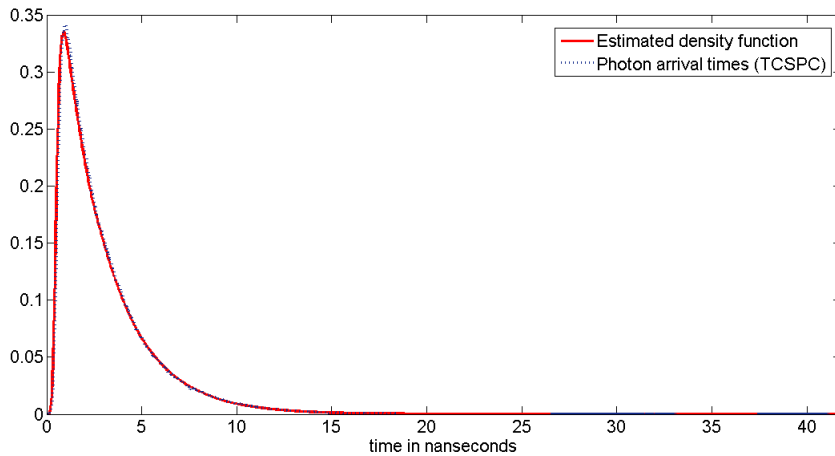


Figure 3.2: Estimated pile-up density function ($\hat{\tau} = 2.5393$) and (normalized) TCSPC measurements.

3.4.3 REDUCTION OF THE ACQUISITION TIME

We now evaluate the numerical performance of our method. Our study is twofold. First we evaluate the reduction of the acquisition time that is achieved for a given mean square error by increasing the intensity λ . Several single- or multi-exponential target models are considered. Second we compute the asymptotic variance in the single-exponential case and compare it to the Cramér-Rao bound of the pile-up model as λ increases. For simplicity, we do not consider additive noise in this numerical study. We presume that even under the presence of additive noise the results are essentially unchanged.

To investigate the acquisition time of different estimation procedures in the fluorescence set-up, we have to take into account the excitation cycles where no photon is detected. Even though parameter estimates of θ_0 are only based on observations where a photon event occurs, the acqui-

Table 3.1: Empirical bias and variances (in parentheses) for each parameter of standard estimator and corrected MLE for different choices of parameters.

| $K = 1, \nu_1 = 2$ | | | | | | | | | |
|--------------------|---------|--------|-----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|
| sample size m | | 100 | | 500 | | 1,000 | | 5,000 | |
| standard method | ν_1 | 0.9238 | (11.1916) | 0.1484 | (0.2103) | 0.0857 | (0.0895) | 0.0370 | (0.0174) |
| corr. MLE | ν_1 | 0.0459 | (0.0852) | 0.0051 | (0.0162) | 0.0053 | (0.0080) | 0.0006 | (0.0015) |
| $\lambda_0 = 1.32$ | | | | | | | | | |

| $K = 2, \alpha_1 = 0.25, \nu_1 = 0.2, \nu_2 = 2$ | | | | | | | | | |
|--|------------|--------|------------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|
| sample size m | | 500 | | 1,000 | | 5,000 | | 10,000 | |
| standard method | α_1 | 0.0585 | (0.0268) | 0.0196 | (0.0132) | 0.0009 | (0.0021) | 0.0013 | (0.0010) |
| | ν_1 | 0.1098 | (0.0932) | 0.0337 | (0.0153) | 0.0057 | (0.0012) | 0.0030 | (0.0006) |
| | ν_2 | 1.3022 | (192.7044) | 0.2807 | (0.8483) | 0.0581 | (0.0556) | 0.0430 | (0.0243) |
| corr. MLE | α_1 | 0.0046 | (0.0027) | 0.0016 | (0.0013) | 0.0003 | (0.0003) | 0.0002 | (0.0001) |
| | ν_1 | 0.0083 | (0.0021) | 0.0053 | (0.0009) | 0.0013 | (0.0002) | 0.0006 | (0.0001) |
| | ν_2 | 0.0330 | (0.0457) | 0.0109 | (0.0218) | 0.0042 | (0.0043) | 0.0008 | (0.0021) |
| $\lambda_0 = 0.05$ | | | | | | | | | |

| $K = 3, \alpha_1 = 0.4, \alpha_2 = 0.3, \nu_1 = 0.1, \nu_2 = 0.5, \nu_3 = 2$ | | | | | | | | | |
|--|------------|--------|----------|--------------|------------------|--------|------------------|--------------|------------------|
| sample size m | | 1,000 | | 5,000 | | 10,000 | | 50,000 | |
| standard method | α_1 | 0.0226 | (0.0267) | 0.0163 | (0.0123) | 0.0232 | (0.0084) | 0.0131 | (0.0016) |
| | α_2 | 0.0828 | (0.0212) | 0.0746 | (0.0110) | 0.0585 | (0.0083) | 0.0133 | (0.0028) |
| | ν_1 | 0.0089 | (0.0017) | $3.95e^{-5}$ | (0.0004) | 0.0011 | (0.0002) | $1.76e^{-5}$ | ($3.86e^{-5}$) |
| | ν_2 | 0.5778 | (0.5275) | 0.1911 | (0.1483) | 0.0953 | (0.0904) | 0.0096 | (0.0181) |
| | ν_3 | 7.4744 | (7442) | 2.1364 | (259) | 1.7785 | (345) | 0.1343 | (0.3094) |
| corr. MLE | α_1 | 0.0185 | (0.0097) | 0.0059 | (0.0017) | 0.0019 | (0.0008) | 0.0004 | (0.0001) |
| | α_2 | 0.0544 | (0.0074) | 0.0129 | (0.0020) | 0.0064 | (0.0012) | 0.0010 | (0.0002) |
| | ν_1 | 0.0018 | (0.0003) | 0.0006 | ($4.79e^{-5}$) | 0.0002 | ($2.23e^{-5}$) | 0.0001 | ($4.55e^{-6}$) |
| | ν_2 | 0.0844 | (0.0820) | 0.0112 | (0.0165) | 0.0072 | (0.0085) | 0.0035 | (0.0017) |
| | ν_3 | 0.5706 | (4.5160) | 0.0737 | (0.0937) | 0.0418 | (0.0424) | 0.0101 | (0.0077) |
| $\lambda_0 = 1.5$ | | | | | | | | | |

sition time is the time that it takes to collect the data including the events where no photon arrival time is measured.

Assume in the following that N has Poisson distribution on \mathbb{N} (and not restricted on \mathbb{N}^* as in (1.9)). If $N = 0$, the pile-up observation is put $Z = \infty$. Then Z admits a density with respect to \mathcal{L}_+ , defined as the measure on $\mathbb{R}_+ \cup \{+\infty\}$ which puts mass 1 at $+\infty$ and whose restriction on \mathbb{R}_+ is the Lebesgue measure \mathcal{L}_+ . The pile-up density is given by

$$g_{\theta, \lambda}(z) = \begin{cases} \lambda f_{\theta}(z) e^{-\lambda F_{\theta}(z)}, & \text{if } x \in \mathbb{R}_+ \\ e^{-\lambda}, & \text{if } x = \infty \end{cases} \quad (3.37)$$

where f_{θ} is the multi-exponential density defined in (3.20) and $\lambda > 0$ the Poisson parameter. Obviously, observations where no photon event occurs ($Z = \infty$) do not contain any information on the parameter of interest θ_0 . That is why these observations are discarded from the sample for the computation of parameter estimates of θ_0 . The proportion of pile-up observations where a photon is detected depends on the Poisson parameter λ and increases when λ does. We recall that

the average number λ of fluorescence photons per light pulse depends on the laser intensity which can be tuned by the user.

We want to compare the performance of the new corrected MLE to some standard method in fluorescence. The current practice in fluorescence is to avoid the pile-up effect by collecting data at a very low intensity λ . For small λ the probability of more than one photon per laser pulse becomes negligible, e.g. $\mathbb{P}(N > 1) = 0.0012$ if $\lambda_0 = 0.05$. Then data may be considered as realizations of the target distribution f_{θ_0} and not of the pile-up distribution g_{θ_0, λ_0} . Thus, standard estimators for exponential mixtures apply. In data analysis of TCSPC measurements typically a least-square fitting procedure is applied. However, least-squares methods are large-sample methods and hence not suited for small data sets. That is, least-squares methods perform rather poorly on samples with very low bin counts or even empty channels, and the variance of the estimated values is large. Hall & Selinger (1981) showed that for large data sets least-square methods and the standard MLE (for data without pile-up effect) are equivalent, but the MLE dominates on small samples of TCSPC measurements. As it is our interest to reduce the acquisition time and thus to use only small data sets, least-squares fitting is not appropriate. For this reason we compare the corrected MLE applied on pile-up affected data to the performance of the classical EM algorithm for exponential mixtures applied on data collected at a very low intensity λ_0 . In the following we refer to the latter method as the *standard method*.

We consider synthetic data from the pile-up multi-exponential density g_{θ_0, λ_0} given in (3.37) for different choices of parameters. For the standard method data are generated at the low intensity $\lambda_0 = 0.05$, while we use higher intensities λ_0 for the corrected MLE (1.32, 1.5, 2). Let m denote the sample size, or better, the total number of excitation cycles where photons are detected or not. We stress that the observations where no photon event occurs ($Z = \infty$) are discarded from the generated samples of length m . Thus, the effective number of observations used in the algorithms is much smaller than m . For $\lambda_0 = 0.05$ we have $\mathbb{P}(N = 0) = 0.951$ compared to only $\mathbb{P}(N = 0) = 0.368$ when $\lambda_0 = 1$. The empirical bias and variances of both estimators are evaluated for different sample sizes m , each based on 1,000 repetitions and displayed in Table 3.1.

The results in Table 3.1 show that the estimation quality (measured in terms of bias and variance) obtained by the standard method is achieved with only 10% of the observations with the corrected MLE. Thus, a significant reduction of the acquisition time of 90% can be obtained by using data collected at a higher intensity and by applying the new corrected MLE.

Remark 3.11. The corrected MLE requires the Poisson parameter λ_0 . In the fluorescence context an accurate estimate of λ_0 is given by the proportion of observations where no photon is detected. Using $\mathbb{P}(N = 0) = e^{-\lambda_0}$ yields the estimator

$$\hat{\lambda} = \log \left(\frac{m}{\sum_{i=1}^m \mathbb{1}\{Z_i = \infty\}} \right).$$

A comparison of the variance of the corrected MLE to the Cramér-Rao bound provides an explanation of the significant reduction of the acquisition time in fluorescence. Recall that the Cramér-Rao bound is a lower bound of the variance of non biased estimators of θ_0 . In Chapter 2 the Cramér-Rao bound is studied for the pile-up model defined in (3.37). In the single-exponential case ($K = 1$) when λ is known, the Cramér-Rao bound of the exponential parameter θ_0 decreases when λ increases and tends to θ_0^{-2} , which is the Cramér-Rao bound of the exponential model (without pile-up effect), see Figure 3.3. We see that it is unfavorable to choose a rather small λ since the Cramér-Rao bound is very elevated near 0 which implies that any estimator must have large variance and a large number of data is necessary for a reliable estimation of θ_0 .

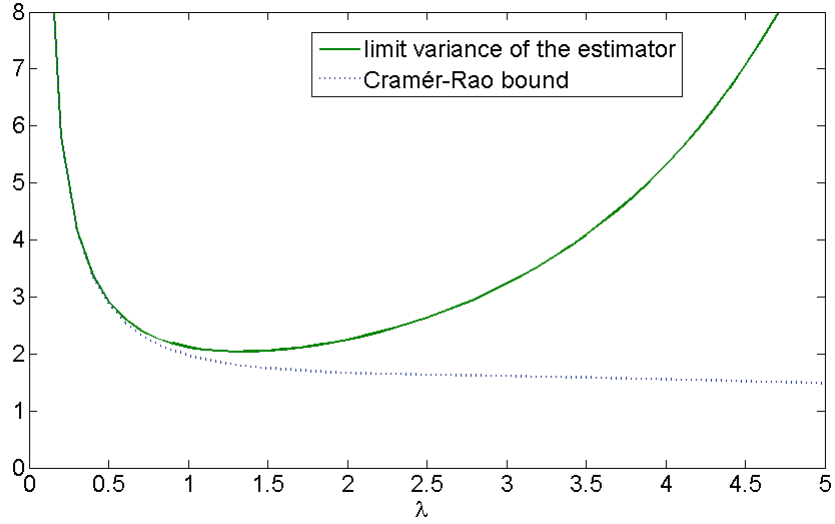


Figure 3.3: Limit variance of the corrected MLE versus Cramér-Rao bound in the exponential case with $\nu_1 = 1$.

Table 3.2: Empirical covariance matrices and Cramér-Rao bounds for different pile-up models.

| $K = 1$ | empirical variance | exact limit variance | Cramér-Rao bound |
|-----------|--------------------|----------------------|------------------|
| $\nu = 2$ | 7.501 | 8.155 | 7.210 |

| $K = 2$ | empirical covariance matrix | | | exact limit variance | | | Cramér-Rao bound | | |
|-------------------|-----------------------------|-------|--------|----------------------|-------|--------|------------------|-------|--------|
| $\alpha_1 = 0.25$ | 1.310 | 0.576 | 3.453 | 1.193 | 0.471 | 2.794 | 1.151 | 0.483 | 2.943 |
| $\nu_1 = 0.2$ | 0.576 | 0.944 | 1.794 | 0.471 | 0.804 | 1.535 | 0.483 | 0.832 | 1.388 |
| $\nu_2 = 2$ | 3.453 | 1.794 | 20.517 | 2.794 | 1.535 | 19.113 | 2.943 | 1.388 | 17.494 |

| $K = 3$ | empirical covariance matrix | | | | | Cramér-Rao bound | | | | |
|------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|------------------|--------|--------|--------|--------|
| $\alpha_1 = 0.4$ | 7.111 | -0.472 | 0.994 | 19.30 | 25.56 | 7.434 | -1.364 | 1.012 | 19.18 | 21.13 |
| $\alpha_2 = 0.3$ | -0.472 | 12.24 | -0.206 | 15.89 | 53.12 | -1.364 | 10.85 | -0.310 | 11.12 | 42.63 |
| $\nu_1 = 0.1$ | 0.994 | -0.206 | 0.227 | 2.543 | 3.036 | 1.012 | -0.310 | 0.229 | 2.431 | 2.420 |
| $\nu_2 = 0.5$ | 19.30 | 15.89 | 2.543 | 82.74 | 141.85 | 19.18 | 11.12 | 2.431 | 75.27 | 114.16 |
| $\nu_3 = 2$ | 25.56 | 53.12 | 3.036 | 141.85 | 384.77 | 21.13 | 42.63 | 2.420 | 114.16 | 299.21 |

The limit variance of the corrected MLE in the exponential case turns out to be given by

$$s^2 = \frac{\theta_0^2 \tau}{\mathbb{P}(N > 0)} = \frac{\theta_0^2 \tau}{1 - e^{-\lambda}},$$

where τ is defined in (3.31). Figure 3.3 shows that the limit variance s^2 attains the Cramér-Rao bound for values of λ up to around 0.7. Furthermore, the limit variance s^2 is minimal at $\lambda_{\min} \approx 1.329$, where s^2 is ten times smaller than the Cramér-Rao bound at $\lambda = 0.05$. This difference coincides with the simulation results of Table 3.1 where we stated a reduction of the acquisition time of a factor ten by using the corrected MLE. Note that the minimum λ_{\min} does not depend on θ_0 .

In the multi-exponential case the Cramér-Rao bound is not explicitly known, but it can be estimated by the inverse of an approximation of the Fisher information matrix obtained by Monte-Carlo. Table 3.2 compares the empirical covariance matrices for the different models of Table 3.1 with the (estimated) Cramér-Rao bounds. Furthermore the values of the limit variances in the cases $K = 1$ and $K = 2$ are computed according to (3.32) and (3.33). From the obvious closeness of the covariance and the Cramér-Rao bound, we conclude that the corrected MLE is (almost) efficient for convenient choices of λ , which explains the significant reduction of the variance in comparison to the standard method.

What is the reason for the bad performance of the corrected MLE for large λ ? While the corrected MLE attains the Cramér-Rao bound for values of λ up to a certain level, its variance increases significantly for large values of λ . We give a possible heuristic explanation of this matter. The corrected MLE is based on weighting the ordered observations, where the weights increase with the order. Namely, when a rather long arrival time is observed, it is very likely that $N = 1$, that is that there is no other photon. Hence, the ‘true’ distribution f_{θ_0} is observed. For this reason higher weights are associated with large observations. Now the weights depend on the Poisson parameter λ . From (3.14) we note that the weights for large observations grow exponentially with λ while the weights for short observations decrease even more. It follows that, if λ is large enough, the estimator relies almost entirely on the largest observations without taking much into account the short observations. It is as if the sample size diminishes. This movement is contrary to the augmentation of the proportion of events where a photon is detected when λ increases. Obviously, for small λ the latter augmentation is dominant, but for λ exceeding λ_{\min} the effect of large weights on the estimation procedure becomes predominant and increases the variance of the estimator.

3.4.4 TECHNICAL CONSTRAINTS OF TCSPC

We study the performance of the corrected MLE in the TCSPC-context. The influence of technical constraints of TCSPC on the data is investigated. Notice that TCSPC measurements always have the form of a histogram. That is no continuous observations are available, but histogram data whose resolution is defined by the width of the histogram bins. A second feature of TCSPC measurements is the *cutoff effect*. There is a finite duration T where the observation of a photon is possible. If a photon arrives after time T , it gets lost. It follows that TCSPC data are right-censored. In the following the influence of these two features on the performance of the corrected MLE is investigated.

Table 3.3: Effect of using histogram data on the corrected MLE. Empirical mean and standard deviation (in parentheses) of the estimates based on 100 data samples of a two-component model with intensity $\lambda = 1.3$.

| | continuous | bin width 0.01 | 0.1 | 0.5 |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| $\tau_1 = 6$ | 6.0232 (.3218) | 6.0233 (.3216) | 6.0275 (.3215) | 6.1304 (.3213) |
| $\tau_2 = 1.5$ | 1.5006 (.0453) | 1.5007 (.0453) | 1.5025 (.0451) | 1.5474 (.0433) |
| $\alpha_1 = 0.3$ | 0.2999 (.0241) | 0.2999 (.0241) | 0.2994 (.0240) | 0.2880 (.0227) |

Table 3.4: Cutoff effect on the corrected MLE. Empirical bias and standard deviation (in parentheses) of the estimates based on 100 data samples of a two-component model with intensity $\lambda = 1$.

| | no cutoff | $T = 30$ ns | $T = 20$ ns | $T = 15$ ns | $T = 10$ ns |
|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| $\tau_1 = 4$ | 4.003 (.0430) | 3.953 (.0395) | 3.645 (.0358) | 3.170 (.0246) | 2.318 (.0143) |
| $\tau_2 = 1$ | 1.001 (.0098) | 0.993 (.0096) | 0.947 (.0098) | 0.872 (.0099) | 0.691 (.0109) |
| $\alpha_1 = 0.4$ | 0.399 (.0071) | 0.405 (.0069) | 0.443 (.0074) | 0.510 (.0077) | 0.691 (.0079) |

Histogram data

We stress that the corrected MLE was originally developed for *continuous* observations from the pile-up distribution and not for histogram counts, although this is the inevitable form of TCSPC measurements. The following simulations aim at evaluating the effect of using histogram data on the estimation accuracy of the corrected MLE.

We generated continuous data from a two-component pile-up model (with lifetime constants $\tau_1 = 1/\nu_1 = 6$ ns, $\tau_2 = 1/\nu_2 = 1.5$ ns, mixing weights $\alpha_1 = 0.3$, $\alpha_2 = 0.7$, intensity $\lambda = 1.3$ and sample size 10,000) and computed the corrected MLE. Then the same data are grouped to obtain histograms with varying bin widths (0.01, 0.1 and 0.5 ns) and the corrected MLE is computed using the histogram data. This procedure was repeated for 100 synthetic data samples. The empirical bias and the standard deviation are shown in Table 3.3. We observe that the estimation based on continuous data is very accurate and that the means and standard deviations are almost identical for a bin width of 0.01. Even for a bin width of 0.1 the accuracy of estimation is very acceptable. For bin width 0.5 the estimator becomes slightly biased. The same conclusions can be drawn from the boxplots in Figure 3.4. A difference to the quality achieved with continuous data is only observable for bin width 0.5. High performance instruments in TCSPC achieve a resolution of 0.001. We conclude that the fact that TCSPC measurements are histogram counts is not a hindrance for the application of the corrected MLE. Nevertheless, using short bin widths always favors the estimation quality.

Cut-off Effect

A second technical constraint is the cut-off after a necessarily finite observation time T after the excitation pulse. That means, that after the excitation one does not wait indefinitely to detect a fluorescence photon. Hence, it is possible that photons are not observed because they arrive after time T . The following simulations investigate the effect of this cut-off on the accuracy of the corrected MLE. Therefore, we generated 100 synthetic data samples of size 100,000 from a

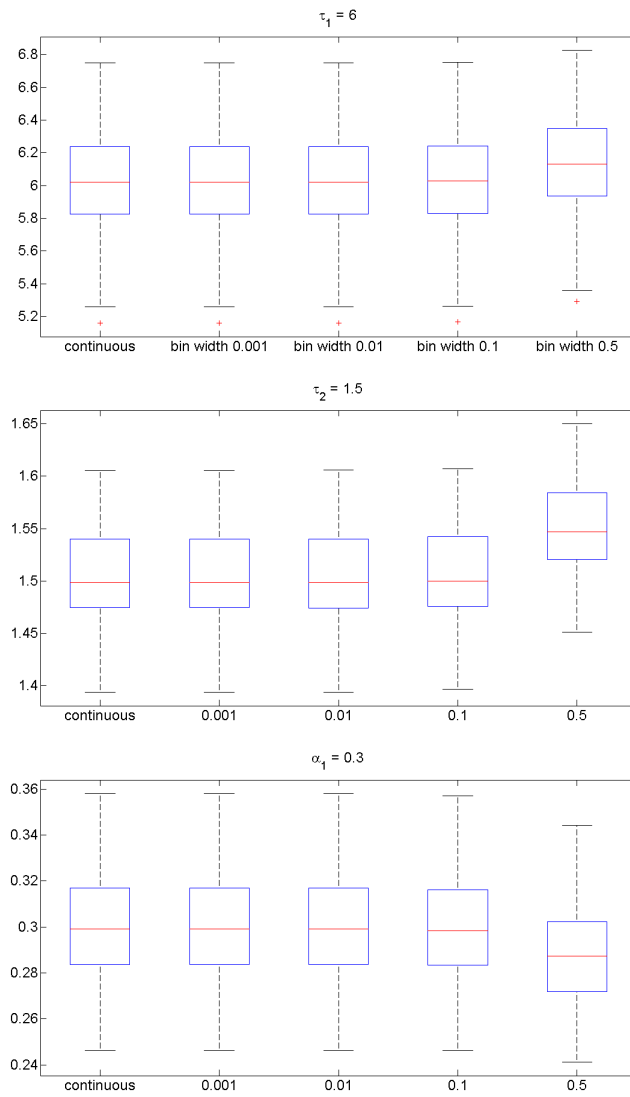


Figure 3.4: Effect of using histogram data on the corrected MLE. Boxplots of the estimates based on 100 data samples of a two-component model with intensity $\lambda = 1.3$.

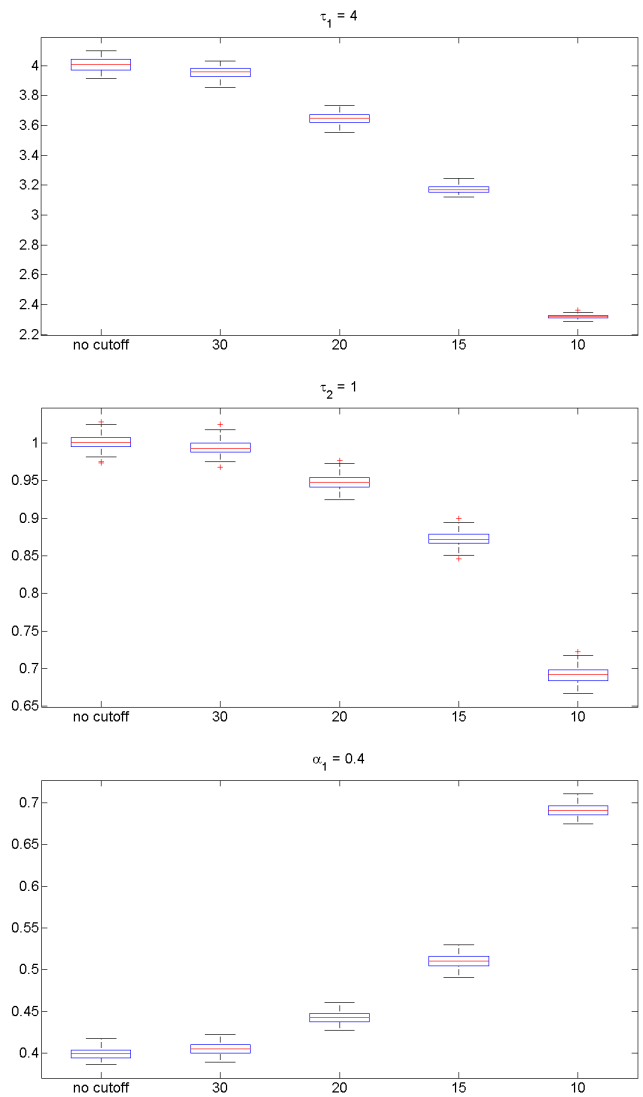


Figure 3.5: Effect of cutting off data on the corrected MLE. Boxplots of the bias (i.e. parameter estimates minus the true value) based on 100 data samples of a three-component model with intensity $\lambda = 1$.

Table 3.5: Comparison of bias and variance of Coates method and corrected MLE. Histogram data with bin width 0.1 and sample sizes 10.000, 10.000 and 15.000, resp. The intensities are $\lambda = 1.5, 1.2$ and 1.8 , resp.

| $K = 1$ | Coates | | corrected MLE | |
|---------------|---------------|------------------|----------------|------------------|
| true values | bias | variance | bias | variance |
| $\nu_1 = 0.5$ | $14.76e^{-4}$ | $(0.5283e^{-4})$ | $8.9916e^{-4}$ | $(0.3993e^{-4})$ |

| $K = 2$ | Coates | | corrected MLE | |
|-------------------|--------|----------|---------------|----------|
| true values | bias | variance | bias | variance |
| $\nu_1 = 0.5$ | 0.0075 | (0.0017) | 0.0006 | (0.0017) |
| $\nu_2 = 1.5$ | 0.0116 | (0.0037) | 0.0029 | (0.0034) |
| $\alpha_1 = 0.25$ | 0.0088 | (0.0017) | 0.0030 | (0.0016) |

| $K = 3$ | Coates | | corrected MLE | |
|------------------|--------|----------|---------------|----------|
| true values | bias | variance | bias | variance |
| $\nu_1 = 1.5$ | 0.0242 | (0.0281) | 0.0210 | (0.0265) |
| $\nu_2 = 0.5$ | 0.0320 | (0.0301) | 0.0271 | (0.0288) |
| $\nu_3 = 0.2$ | 0.0070 | (0.0010) | 0.0078 | (0.0010) |
| $\alpha_1 = 0.5$ | 0.0197 | (0.0105) | 0.0173 | (0.0099) |
| $\alpha_2 = 0.3$ | 0.0330 | (0.0046) | 0.0330 | (0.0045) |
| $\alpha_3 = 0.2$ | 0.0133 | (0.0064) | 0.0156 | (0.0062) |

two-component model with lifetime constants $\tau_1 = 1/\nu_1 = 4, \tau_2 = 1/\nu_2 = 1$, mixing weights $\alpha_1 = 0.4, \alpha_2 = 0.6$ and intensity $\lambda = 1$. The corrected MLE is first computed for the complete data sample, then for the data with a cut-off at several observation times (30, 20, 15 and 10 ns). On average 12.9, 159, 552 and 1 945 photons get lost by the cutoff out of 100,000 photon arrival times, respectively. Table 3.4 shows the empirical bias and standard deviation of the estimators. We observe that the cut-off has a strong effect on the estimator. Even cutting off only a very small proportion of the data has an impact on the estimates, which become immediately biased. The boxplots in Figure 3.5 lead to the same conclusion. Indeed, the corrected MLE is based on the principle that a large observation occurs especially when there was no other photon, i.e. if $N = 1$, and hence the distribution of the arrival times is directly observed without pile-up distortion. This explains the choice of weights $w_{i,n}$ that increase in i . Hence, the largest observations have the greatest influence on the corrected MLE and cutting off some of the largest observations has severe consequences for the estimated parameter values.

We draw the conclusion that using histogram data is almost without consequences for the corrected MLE, however one should very carefully choose the observation time T to avoid any censoring.

3.4.5 COMPARISON TO THE COATES CORRECTION

The Coates method is a ‘correction’ of pile-up affected histograms (Coates, 1968). A similar comparison as in Subsection 2.4 of our new estimator with the Coates method is performed. More precisely, the Coates correction is applied on simulated histogram data, then parameter estimates are computed by the classical EM algorithm for multi-exponential observations. On the same histogram data the corrected MLE is applied. The empirical bias and variances based on 100 samples are displayed in the Table 3.5 for various multi-exponential target distributions.

We observe that in the single- and double-exponential case the performance of the corrected MLE is uniformly better than the performance of the Coates method. When $K = 3$, the bias are comparable but the variances of the corrected MLE are still smaller than the ones of the Coates method.

Note that in Subsection 2.4 the Gibbs sampler, when applied to histogram data, had a worse performance than the Coates method in the multi-exponential case. But here we see that the corrected MLE performs better than Coates. We stress that the corrected MLE is applied on the histogram data and not on continuous data. In general one can conclude that the corrected MLE is preferable to the Coates method.

3.4.6 NONPARAMETRIC MAXIMUM LIKELIHOOD ESTIMATOR

We now consider a pile-up model where the target model is an infinite mixture of exponential distributions. We show that the corrected MLE can be applied to this estimation problem.

We suppose that the target distribution in the pile-up model is an infinite mixture with mixture density given by

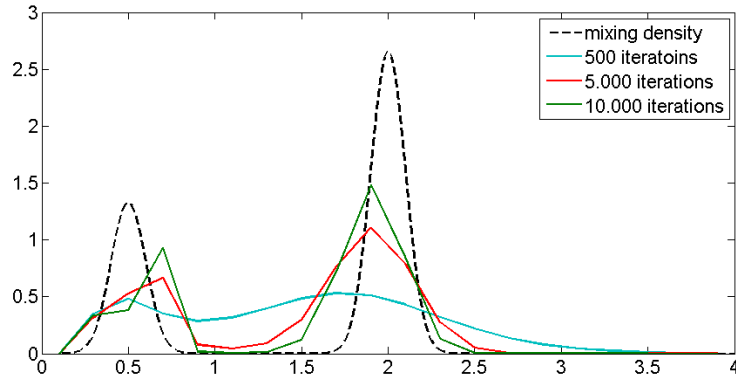
$$f_\alpha(x) = \int \pi_\theta(x)\alpha(\theta)d\theta, \quad (3.38)$$

where π_θ are the component densities and α represents a probability density on Θ , called the *mixing density*.

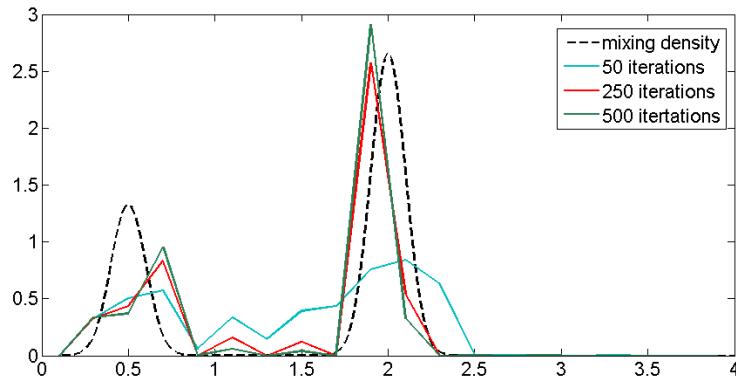
For the case of observing a sample from the mixture distribution f_α the nonparametric maximum likelihood estimator (NPMLE) is a probability measure with finite support, see e.g. Lindsay (1995). Indeed, the number of support points does not exceed the number of observations. Hence routines that are adapted to finite mixtures may be used to compute the NPMLE. The classical EM algorithm for finite mixture distributions can be used to compute the NPMLE of the mixing distribution of an infinite mixture. In this case the EM algorithm is applied to a fine grid of parameter values. Hence, the infinite mixture f_α of (3.38) is approximated by a finite mixture

$$\sum_{k=1}^K \alpha_k \pi_{\theta_k},$$

where the mixture order K is large and the mixture components π_{θ_k} are fixed and known. Typically, equally spaced values θ_k are used. The estimation of the mixing weights α_k can be done with the classical EM algorithm, but the convergence is very slow. An accelerated version of the EM algorithm, called the *rotated EM algorithm*, is proposed in Pilla & Lindsay (2001). This algorithm allows by the way to eliminate mixture components. Here we show that the same acceleration can successfully be applied to the corrected MLE in the pile-up model.



a) Classical EM algorithm



b) Rotated EM algorithm

Figure 3.6: Comparison of the convergence of classical and rotated EM algorithm. The figures show the true mixing density and its estimates after different numbers of iterations.

Figure 3.6 compares the speed of convergence of both algorithms for data of an infinite mixture f_α . Both methods are applied on a same sample of size 2.000 from an infinite exponential mixture f_α , that is π_θ are exponential densities. The mixing density is a normal mixture with two components, $\alpha = 0.33\mathcal{N}(0.5, 0.01) + 0.66\mathcal{N}(2, 0.01)$. The initial values of the weights were chosen to be uniform on a grid of equally spaced exponential parameters (from 0.1 to 3.9 with step width 0.2). Although both methods converge to the correct solution, the speed of convergence is not at all same. The classical EM algorithm needs several thousands of iterations, while the rotated EM method has converged after a few hundred iterations. A further difference is that in the solution of the classical EM algorithm all weights are strictly positive, whereas the rotated EM algorithm sets half of the components to zero.

Rotated EM Algorithm

The extremely slow convergence of the classical EM algorithm is due to problem that there are too many highly correlated parameters θ_k that the algorithm has to compare simultaneously. A successive reparametrization in the rotated EM algorithm introduces two levels of parameters with simplified missing variables, which will be beneficial for the speed of convergence. The

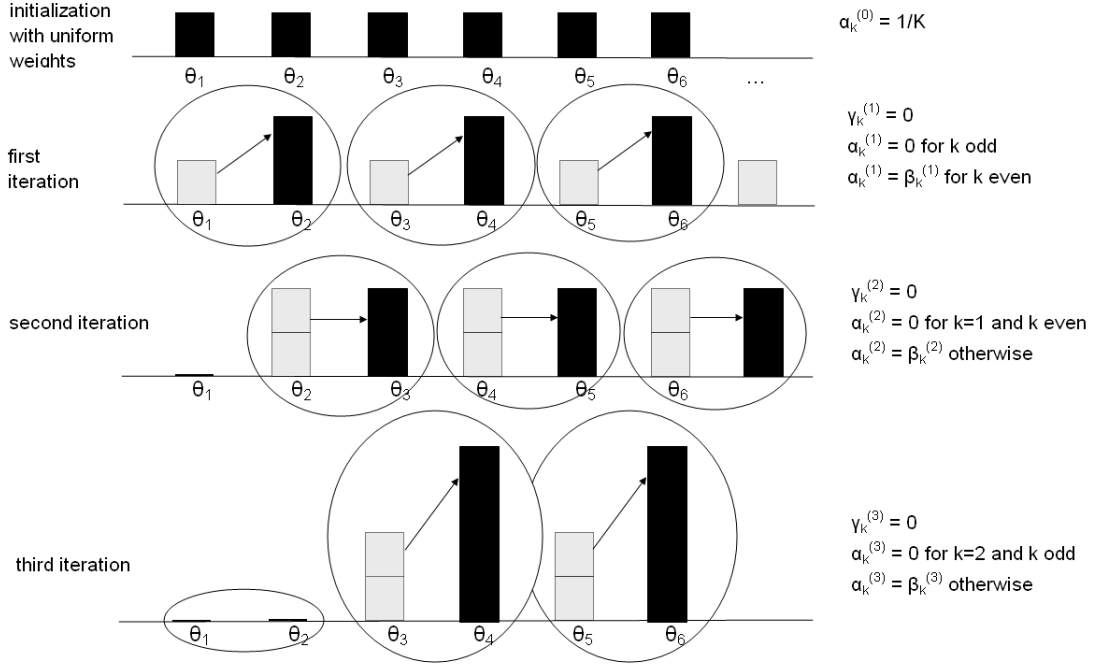


Figure 3.7: Acceleration of the EM algorithm by pair rotation

reparametrization consists in pairing the parameters (θ_k, θ_{k+1}) of correlated component densities π_{θ_k} and $\pi_{\theta_{k+1}}$. Then one defines new parameters, for all odd k , $\beta_k = \alpha_k + \alpha_{k+1}$ the weight associated with the pair (θ_k, θ_{k+1}) and $\gamma_k = \alpha_k / \beta_k \in [0, 1]$ the ‘distribution’ within the pair.

This parameterization allows to use new missing variables. In the classical EM algorithm the missing variable is the component label that has generated the observation. Now, one can use the *label of the pair* of mixture components that has generated the observation. The advantage is that the space where the latent variable takes its values is reduced about half. This will improve the performance.

More precisely, let S denote the missing variable taking values in $\{1, 3, \dots, K/2\}$. Then the E-step consists in maximizing

$$\begin{aligned} \theta \mapsto Q(\theta, \theta') &= \sum_{i=1}^n \mathbb{E}_{\theta'} [\log \beta_S (\gamma_S \pi_{\theta_S}(Y_i) + (1 - \gamma_S) \pi_{\theta_{S+1}}) \mid Y = Y_i] \\ &= \sum_{i=1}^n \mathbb{E}_{\theta'} [\log \beta_S \mid Y = Y_i] + \sum_{i=1}^n \mathbb{E}_{\theta'} [\log (\gamma_S \pi_{\theta_S}(Y_i) + (1 - \gamma_S) \pi_{\theta_{S+1}}) \mid Y = Y_i]. \end{aligned}$$

The computation of updates of the pair weights β_k is straightforward. Furthermore, we obtain independent optimization problems for each γ_k , namely to maximize

$$\gamma \mapsto R_k(\gamma) = \sum_{i=1}^n \mathbb{P}_{\theta'} (S = k \mid Y = Y_i) \log (\gamma \pi_{\theta_k}(Y_i) + (1 - \gamma) \pi_{\theta_{k+1}}).$$

These maximization problems do no longer have explicit solutions for the values of γ_k . However,

as R_k are univariate functions, one can use standard maximization procedures as the Newton-Raphson method to determine the maximum. Generally a single Newton-Raphson step is sufficient, as recommended by Pilla & Lindsay (2001) and Lange (1995).

The acceleration of the convergence is obtained at the level of the γ_k , because during one iteration the value of γ_k can change drastically. That is, within a pair all mass can be shifted to one of the components. The boundary points 0 and 1 can be reached, which means to put the corresponding component weight α_k to zero. In order to quickly shift the mass not only within pairs but on the whole grid, it is necessary to rotate the pairing scheme at each iteration. That is, if one carries out an EM step with pairings $(\theta_1, \theta_2), (\theta_3, \theta_4), \dots$, then the next EM step is carried out on the pairs $\theta_1, (\theta_2, \theta_3), (\theta_4, \theta_5), \dots$. Figure 3.7 illustrates the rotation of the pairings and shows how the mass is shifted rapidly. In this example we suppose that the mass of the mixing distribution α is somewhere to the right of the parameters $\theta_1, \dots, \theta_6$. Then typically in each step the values of γ_k are set to 0, that is within a pair all mass is given to the component on the right. Then the mass of the weights α_k is quickly shifted to the right.

Note that the Newton-Raphson method may not respect the constraint that γ_k lie in $[0, 1]$. If Newton-Raphson oversteps, resulting in $\gamma_k > 1$, we check whether or not the derivative $R'_k(1) < 0$. If so, then the global maximum is to the left of 1, and we proceed back toward that solution by taking one Newton-Raphson step from $\gamma_k = 1$. Otherwise, the global maximum is to the right of 1, which implies that $\gamma_k = 1$ is the global constrained solution. The equivalent procedure is applied when $\gamma_k < 0$.

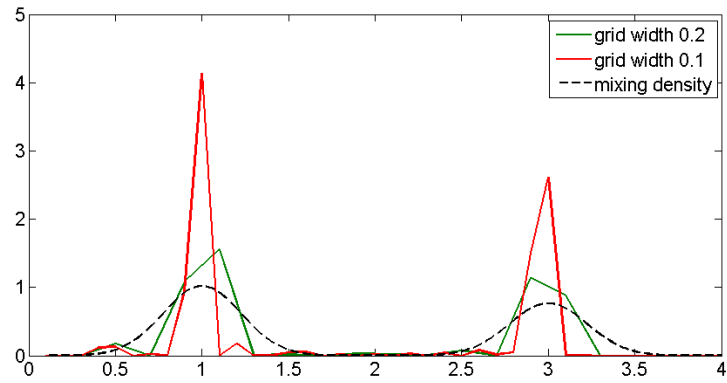
Rotated EM for the Corrected MLE

If the target distribution in a pile-up model is an infinite mixture density f_α as defined in (3.38), then the same acceleration scheme can be applied to improve the convergence of the EM algorithm. That is the corrected MLE applied on a grid of fixed components yields an estimator of the mixing density α . We call this estimator the *corrected NPLME*. The algorithm is accelerated by using a reparametrization based on pairing of component densities and at each EM step the pairing scheme is rotated.

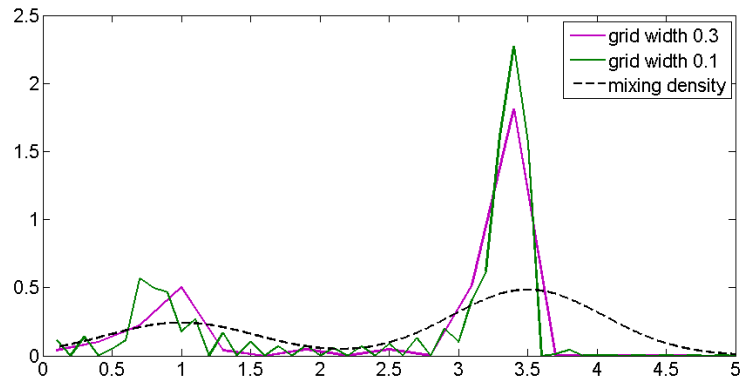
Figure 3.8 and 3.9 show some examples of the corrected NPMLE of the mixing distribution computed by the rotated EM. We see that in these examples the corrected NPMLE performs well, that is the estimator is close to the true mixing density α . However one should not forget that infinite mixtures are very ill-posed problems and in numerous examples the EM algorithm converges to some local maximum of the corrected likelihood function. The performance is especially bad when the mixing density is flat or when peaks are not well separated. Furthermore, the estimator depends on the choice of the grid (the number of grid points and the step width). In general the corrected NPMLE suffers from the same drawbacks as the NPMLE based on observations from the mixture distribution f_α .

In the paper of Pilla & Lindsay (2001) further propositions are made that may improve the performance. For example, some components may be definitely eliminated from the grid after some iterations. In addition, the principle of pairing components is generalized by forming larger blocks of components, to which is referred to as the hierarchical EM. Even if these strategies are beneficial for the convergence of the algorithm, they cannot remedy the ill-posedness of the problem.

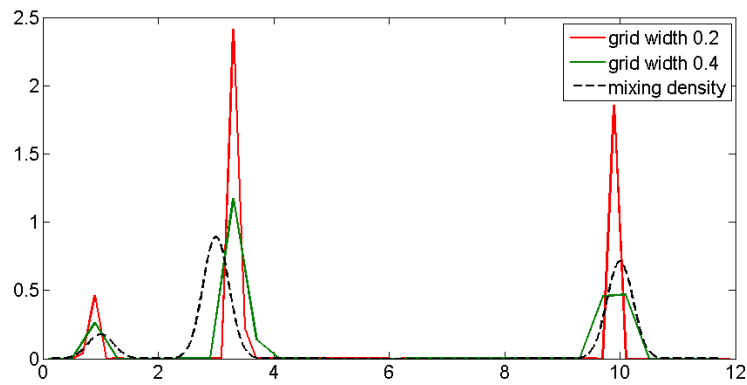
Nevertheless, the corrected NPMLE is a good means to get more insight on the mixing density



a) Mixture of two normal distributions with small variances.

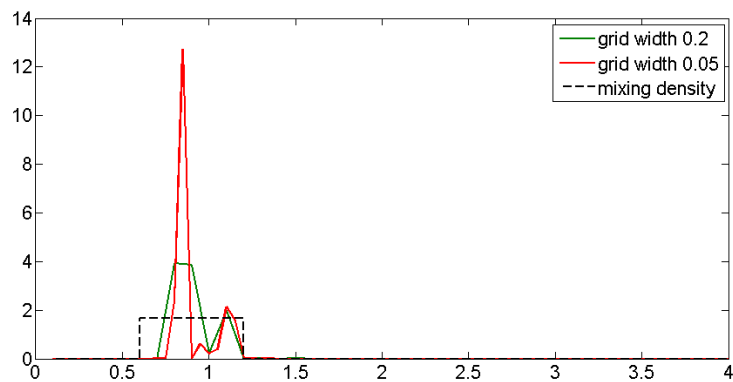


b) Mixture of two normal distributions with larger variances.

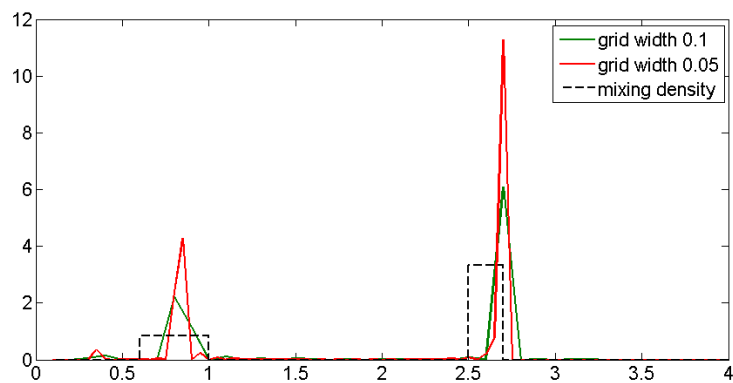


c) Mixture of three normal distributions with small variances.

Figure 3.8: Corrected NPMLE of the mixing distribution computed by the rotated EM. Normal mixture mixing distribution



a) Uniform mixing density.



b) Mixture of two uniform densities.

Figure 3.9: Corrected NPMLE of the mixing distribution computed by the rotated EM. Uniform mixing distribution.

in question, especially on the zones where the mixing density is supported and the number of such zones. In many cases the estimator gives good approximations of the mixing density. But we recommend to use it with caution, as one may never be sure whether the algorithm converges to a local or the global maximum of the likelihood.

3.5 DISCUSSION

In this chapter we have developed a general estimation approach for the pile-up model. It is a likelihood-based estimator that is easily computed by the EM-algorithm if the target distribution is e.g. a mixture distribution. The consistency and asymptotic normality of the estimator are established under appropriate conditions. A numerical study and an application to real fluorescence lifetime measurements demonstrate the good performance of the corrected MLE.

We now turn to a comparison of the corrected MLE and the Gibbs sampler. Both algorithms have in common that they are well-suited for the multi-exponential case. They provide accurate parameter estimates and are both efficient in the sense that they achieve the Cramér-Rao bound. We remark that the corrected MLE is efficient only for intensities $\lambda \leq 0.7$, while the Gibbs sampler is efficient for any intensity λ . Nevertheless, both algorithms allow to reduce the variance significantly in comparison to the standard method used in fluorescence.

Advantages of the Gibbs sampler include the fact that the estimation of the intensity λ as well as a cut-off correction are integrated in the algorithm. In contrast the corrected MLE has the advantage that it is a more general estimation approach which is appropriate for a large variety of target models, especially for all models where the EM algorithm applies naturally. Consequently, the corrected MLE is well-suited for all relevant target models occurring in the TCSPC application. Furthermore, the corrected MLE is advantageous concerning the computing time. Especially when histogram data are used, the computing time only depends on the number of histogram bins and not on the number of observations. Such a simplification is not possible for the Gibbs sampler, where the computing time increases with the number of observations and the intensity λ . We draw the conclusion that from a practical viewpoint of the fluorescence application the corrected MLE outperforms the Gibbs sampler.

Our estimation approach is not limited to the pile-up model. We presume that for any inverse problem where the distribution G of the observations is related to the target distribution F by some known function M in the following way

$$G = M \circ F . \tag{3.39}$$

An equivalent relation for moments as (3.5) then holds, that is $\mathbb{E}[h(Y)] = \mathbb{E}[\gamma \circ G(Z)h(Z)]$ with $\gamma(u) = 1/M' \circ M^{-1}(u)$ provided that M is invertible and differentiable. Examples of this kind of inverse problems include the observation of some empirical quantile of a random number of variables with distribution F . More generally, let Y_1, Y_2, \dots be a sequence of i.i.d. random variables with distribution F . Let (N, I) be a random vector that is independent from this sequence taking its values in \mathbb{N}^2 and satisfying $I \leq N$ almost surely. Define the observation $Z = Y_{(I,N)}$ as the I -th order statistic of the sample (Y_1, \dots, Y_N) . Then the distribution G of Z is

given by

$$G(z) = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbb{P}(N = n) \sum_{s=1}^n \mathbb{P}(I = s) \sum_{k=s}^n \binom{n}{k} F(z)^k (1 - F(z))^{n-k} .$$

Note that the pile-up model is a special case with $I \equiv 1$ almost surely.

The estimation approach based on the corrected likelihood developed in this chapter presumably holds for this more general class of inverse problems of form (3.39). However, it remains an open question to which extent the theoretical results of this chapter continue to hold.

3.6 PROOFS

PRELIMINARY RESULTS

The weight function w has some useful properties as stated in the following lemma.

Lemma 3.12. *Under the assumption that $p(1) > 0$, the weight function w defined in (3.6) is strictly increasing and uniformly continuous on $[0, 1]$ taking its values in $[1/\mathbb{E}[N], 1/p(1)]$. In addition, as $n \rightarrow \infty$,*

$$\sup_{u>0} \left| w \circ \hat{G}_n(u) - w \circ G_{\theta_0}(u) \right| \rightarrow 0, \quad a.s. \quad (3.40)$$

Proof. The functions $u \mapsto M(u)$ and $u \mapsto \dot{M}(u)$ are strictly increasing and continuous on $[0, 1]$, except if $\dot{M}(1) = \mathbb{E}[N] = \infty$, in which case $\lim_{u \rightarrow 1} \dot{M}(u) = \infty$. Since $\dot{M}(u) \geq p(1) > 0$ for all $u \in [0, 1]$, it follows from (3.6) that $u \mapsto w(u)$ is strictly increasing and uniformly continuous on $[0, 1]$ with $w(0) = 1/\mathbb{E}[N]$ and $w(1) = 1/p(1)$. Applying the Glivenko-Cantelli theorem, we have $\sup_{u>0} \left| \hat{G}_n(u) - G_{\theta_0}(u) \right| \rightarrow 0$ a.s. and using that w is uniformly continuous yields (3.40). \square

PROOF OF THEOREM 3.2

We have

$$\begin{aligned} \left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w_{i,n} h(Z_{(i,n)}) - \mathbb{E}_{\theta_0}[h(Y)] \right| &= \left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w \circ \hat{G}_n(Z_i) h(Z_i) - \mathbb{E}_{\theta_0}[h(Y)] \right| \\ &\leq \sup_{u>0} \left| w \circ \hat{G}_n(u) - w \circ G_{\theta_0}(u) \right| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |h(Z_i)| + \left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w \circ G_{\theta_0}(Z_i) h(Z_i) - \mathbb{E}_{\theta_0}[h(Y)] \right|. \end{aligned}$$

By Lemma 3.12 the supremum of the last display converges almost surely to 0. Furthermore, the strong law of large numbers yields that $\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |h(Z_i)| \rightarrow \mathbb{E}_{\theta_0}|h(Z)| < \infty$ almost surely, and

$$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w \circ G_{\theta_0}(Z_i) h(Z_i) \rightarrow \mathbb{E}_{\theta_0} [w \circ G_{\theta_0}(Z) h(Z)] = \mathbb{E}_{\theta_0} [h(Y)] \quad a.s. ,$$

where the last equality holds by (3.5). Also, by (3.5)

$$\mathbb{E}_{\theta_0} |h(Y)| = \int |h(y)| g_{\theta_0}(y) w \circ G_{\theta_0}(y) dy \leq \frac{\mathbb{E}_{\theta_0} |h(Z)|}{p(1)} < \infty ,$$

since $p(1) > 0$. This completes the proof.

PROOF OF THEOREM 3.4

It suffices to show that $\hat{\theta}_n$ verifies (3.17). Denote for all t

$$\begin{aligned}\tilde{L}_n(t, \theta_0) &= \tilde{L}_n(t) - \tilde{L}_n(\theta_0) \\ \hat{L}_n(t, \theta_0) &= \hat{L}_n(t) - \hat{L}_n(\theta_0) .\end{aligned}$$

We note that Lemma 3.12 and Condition (3.18) imply that

$$\begin{aligned}\left| \tilde{L}_n(\hat{\theta}_n, \theta_0) - \hat{L}_n(\hat{\theta}_n, \theta_0) \right| &= \left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left\{ w \circ \hat{G}_n(Z_i) - w \circ G_{\theta_0}(Z_i) \right\} \log \frac{f_{\hat{\theta}_n}(Z_i)}{f_{\theta_0}(Z_i)} \right| \\ &\leq \sup_z |w \circ \hat{G}_n(z) - w \circ G_{\theta_0}(z)| \sup_{\theta \in \Theta} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \log \frac{f_{\theta}(Z_i)}{f_{\theta_0}(Z_i)} \right| \\ &= o_p(1) .\end{aligned}\tag{3.41}$$

This implies together with the fact that $\hat{\theta}_n$ is a maximizer of $\theta \mapsto \hat{L}_n(\theta, \theta_0)$ that

$$\begin{aligned}\tilde{L}_n(\hat{\theta}_n, \theta_0) &= \tilde{L}_n(\hat{\theta}_n, \theta_0) - \hat{L}_n(\hat{\theta}_n, \theta_0) + \hat{L}_n(\hat{\theta}_n, \theta_0) \\ &\geq \sup_t \hat{L}_n(t, \theta_0) + o_P(1) \\ &\geq \sup_t \tilde{L}_n(t, \theta_0) + o_P(1) ,\end{aligned}\tag{3.42}$$

where the last inequality is obtained by applying (3.41) again. Finally (3.42) is equivalent to (3.17).

PROOF OF COROLLARY 3.5

Using that $M(u) \geq p(1) > 0$ by Assumption 3.1, we have $\sup_z w(z) \leq 1/p(1) < \infty$ and Condition (3.19) gives that, for any $\theta, \theta' \in \Theta$ and $z \in \mathbb{R}_+$,

$$\left| w \circ G_{\theta_0}(z) \log \frac{f_{\theta}(z)}{f_{\theta_0}(z)} - w \circ G_{\theta_0}(z) \log \frac{f_{\theta'}(z)}{f_{\theta_0}(z)} \right| \leq \frac{1}{p(1)} K(z) \|\theta - \theta'\| .$$

This and the compactness of Θ imply (3.3-i). By the identifiability condition of Assumption 3.1, we know that $\theta \mapsto \text{KL}(f_{\theta_0} \| f_{\theta})$ has a unique minimum at $\theta = \theta_0$. Moreover, observing that

$$\text{KL}(f_{\theta_0} \| f_{\theta}) - \text{KL}(f_{\theta_0} \| f_{\theta'}) = \mathbb{E}_{\theta_0} [\log f_{\theta'}(Y) - \log f_{\theta}(Y)] ,$$

we see that (3.19) and $\mathbb{E}_{\theta_0}[K(Y)] \leq \mathbb{E}_{\theta_0}[K(Z)]/p(1) < \infty$ imply the continuity of $\theta \mapsto \text{KL}(f_{\theta_0} \| f_{\theta})$ over the compact Θ , so that (3.3-ii) holds. Thus Assumption 3.3 holds. To apply Theorem 3.4, we now need to verify Condition (3.18), which follows from (3.19), the compactness of Θ and the fact that $n^{-1} \sum_{i=1}^n K(Z_i)$ has mean $\mathbb{E}_{\theta_0}[K(Z)] < \infty$.

PROOF OF LEMMA 3.7

We observe that, by (3.5) and (3.13),

$$\nu_n^c r(\cdot, t) - \tilde{\nu}_n(w \circ G \times r(\cdot, t)) = \sqrt{n} \tilde{P}_n \left\{ (w \circ \hat{G}_n - w \circ G) \times r(\cdot, t) \right\} .$$

Hence

$$|\nu_n^c r(\cdot, t) - \tilde{\nu}_n(w \circ G \times r(\cdot, t))| \leq \sqrt{n} \|w \circ \hat{G}_n - w \circ G\|_\infty \tilde{P}_n |r(\cdot, t)| .$$

By (Kallenberg, 2002, Theorem 14.15), we have $\sqrt{n} \|\hat{G}_n - G\|_\infty = O_P(1)$ and by Lipschitz continuity of w , $\sqrt{n} \|w \circ \hat{G}_n - w \circ G\|_\infty = O_P(1)$. Hence Condition (vi) follows from (3.25) and (3.26).

PROOF OF LEMMA 3.8

Since $\dot{h}(z, \cdot)$ denotes the derivative of $h(z, \cdot)$ in U , we have, for all $s, t \in U$,

$$h(z, t) = h(z, s) + \int_{u=0}^1 (t-s)^t \dot{h}(z, tu + s(1-u)) du .$$

By definition of r in (3.23) with $\Delta = \dot{h}(\cdot, \theta_0)$, we obtain

$$\begin{aligned} r(z, t) &= |t - \theta_0|^{-1} \left(h(z, t) - h(z, \theta_0) - (t - \theta_0)^T \dot{h}(z, \theta_0) \right) \\ &= \frac{(t - \theta_0)^T}{|t - \theta_0|} \int_{u=0}^1 \left(\dot{h}(z, tu + \theta_0(1-u)) - \dot{h}(z, \theta_0) \right) du . \end{aligned} \quad (3.43)$$

It also follows that

$$\begin{aligned} r(z, t) - r(z, s) &= \left(\frac{(t - \theta_0)^T}{|t - \theta_0|} - \frac{(s - \theta_0)^T}{|s - \theta_0|} \right) \int_{u=0}^1 \left(\dot{h}(z, tu + \theta_0(1-u)) - \dot{h}(z, \theta_0) \right) du \\ &\quad + \frac{(s - \theta_0)^T}{|s - \theta_0|} \int_{u=0}^1 \left(\dot{h}(z, tu + \theta_0(1-u)) - \dot{h}(z, su + \theta_0(1-u)) \right) du . \end{aligned} \quad (3.44)$$

We apply Lemma 3.7 so that it is sufficient to verify that (3.25) and (3.26) hold. Condition (3.25) holds because, by (3.27) and (3.43),

$$|r(z, t)| \leq K(z) |t - \theta_0| . \quad (3.45)$$

We now prove Condition (3.26) as an application of (Pollard, 1985, Lemma 4). Using (3.27), (3.44) and

$$\left| \frac{(t - \theta_0)^T}{|t - \theta_0|} - \frac{(s - \theta_0)^T}{|s - \theta_0|} \right| \leq 2 \frac{|t - s|}{|t - \theta_0|} ,$$

we have

$$|r(z, t) - r(z, s)| \leq 3K(z) |t - s| .$$

Thus, since $\mathbb{E} [|w \circ G(Z) K(Z)|]$ is bounded by (3.28) and the assumption on w , the class of functions $\mathcal{F} = \{w \circ G \times r(\cdot, t), t \in U\}$ satisfies the bracketing condition of Pollard (1985). The other condition to verify for applying (Pollard, 1985, Lemma 4) is

$$\mathbb{E} \left[\sup_{|t - \theta_0| \leq R} |w \circ G(Z) r(Z, t)|^2 \right] \rightarrow 0 \quad \text{as } R \rightarrow 0 .$$

This follows from (3.45) and (3.28). This concludes the proof.

CHAPTER 4

MINIMAX ESTIMATION OF THE MIXING DENSITY OF AN INFINITE MIXTURE

We consider the inverse problem where f is the mixing density and observations are available only from the infinite mixture density π_f defined as

$$\pi_f(x) = \int_{\Theta} f(t)\pi_t(x)dt, \quad (4.1)$$

where $\{\pi_t, t \in \Theta\}$ is a parametric collection of probability densities. The goal is to estimate the mixing density f . In contrast with finite mixtures models, the distribution of the latent variable t is not bounded to a finite set but is spread out, say, over a given interval $\Theta = [a, b]$.

In this chapter, let π_t be densities with respect to the Lebesgue measure on the positive half line and let t denote a scale parameter. We construct an estimator based on an orthonormal sequence $(\psi_k)_k$ by estimating the first m coefficients α_k of the expansion $f = \sum_k \alpha_k \psi_k$. We derive minimax upper and lower bounds of the mean integrated squared error which apply in various contexts. The case of exponential densities $\pi_t(x) = te^{-tx}$ is specifically studied. It is shown that in this case the orthogonal series estimator achieves the minimax rate. Simulation results of the estimator are provided.

The same approach can be adapted to the pile-up model. That is, we consider a pile-up model where the target distribution is an infinite exponential mixture. Then an orthogonal series estimator can be used to estimate the mixing density of the infinite mixture, since the coefficients α_k of the expansion of f in an orthogonal series can be written as moments of the mixture distribution π_f . Hence, the coefficients α_k can be consistently estimated by weighted means based on observations of the pile-up model.

4.1 ESTIMATION METHOD

We aim at estimating the mixing density f from i.i.d. observations distributed according to the mixture density π_f defined by (4.1). A nonparametric maximum likelihood estimate can be

applied in this context but it yields a discrete mixing distribution (Laird, 1978; Lindsay, 1983). This is unsatisfactory if we have reasons to believe that the mixing density is indeed continuous. Other approaches rely on smoothness assumptions on the mixing density f . In Zhang (1990, 1995) kernel estimators are constructed for mixing densities of a location parameter. Goutis (1997) proposes an iterative estimation procedure that is also based on kernel methods. For mixtures of discrete distributions, i.e. π_t are densities with respect to the counting measure on a discrete space, orthogonal series estimators have been developed and studied in Hengartner (1997) and Roueff & Ryden (2005). Here we propose an orthogonal series estimator where $\{\pi_t, t \in \Theta\}$ is a scale family dominated by the Lebesgue measure on \mathbb{R}_+ .

4.1.1 ORTHOGONAL SERIES ESTIMATOR

Throughout this chapter denote by $\{\pi_t, t \in \Theta\}$ a parametric collection of densities with respect to the Lebesgue measure on \mathbb{R}_+ . Assume that the mixing density f in (4.1) is square integrable and supported on the interval $[a, b]$ with known endpoints $0 < a < b < \infty$, that is $f \in L^2[a, b]$.

For any complete orthonormal basis $(\psi_k)_{k \geq 1}$ of the Hilbert space $\mathbb{H} \equiv L^2[a, b]$, the mixing density f can be represented by $f(t) = \sum_{k \geq 1} \alpha_k \psi_k(t)$. Hence, an approximation of f is given by

$$\sum_{k=1}^m \alpha_k \psi_k . \quad (4.2)$$

For a given sequence $(\psi_k)_k$ the aim is to estimate the coefficients α_k which correspond to the inner products of f and ψ_k .

We remark that the following relation holds: Let g be a nonnegative integrable function on \mathbb{R}_+ . Define the function φ on $[a, b]$ by

$$\varphi(t) = \int_0^\infty g(x) \pi_t(x) dx , \quad t \in [a, b] . \quad (4.3)$$

Suppose that φ belongs to \mathbb{H} . Then the mean $\mathbb{E}[g(X)]$ can be written as the inner product of f and φ . Namely, by the definition of π_f and Fubini's theorem,

$$\mathbb{E}[g(X)] = \int_0^\infty \pi_f(x) g(x) dx = \int_a^b f(t) \int_0^\infty g(x) \pi_t(x) dx dt = \langle f, \varphi \rangle_H .$$

Consequently, by the strong law of large numbers, $\frac{1}{n} \sum_i g(X_i)$ is a consistent estimator of the inner product $\langle f, \varphi \rangle_H$ based on a sample (X_1, \dots, X_n) from the mixture density π_f defined in (4.1).

Now let g_1, \dots, g_m be functions such that the associated functions $\varphi_1, \dots, \varphi_m$ given by relation (4.3) are linearly independent in \mathbb{H} . By linear combination of the φ_k , a sequence of orthonormal functions (ψ_1, \dots, ψ_m) in \mathbb{H} can be constructed, for instance by the Gram-Schmidt procedure. Say that ψ_k writes as $\sum_{j=1}^m Q_{k,j} \varphi_j$ with known real numbers $Q_{k,j}$. Then we define estimators of $\alpha_k = \langle f, \psi_k \rangle = \sum_{j=1}^k Q_{k,j} \langle f, \varphi_j \rangle$ by

$$\hat{\alpha}_k = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k Q_{k,j} g_j(X_i) .$$

It follows that an estimator of f is given by

$$\hat{f}_{m,n} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^m \hat{\alpha}_k \psi_k = \frac{1}{n} \sum_{k,j,l=1}^m \sum_{i=1}^n Q_{k,j} Q_{k,l} g_j(X_i) \varphi_l. \quad (4.4)$$

We refer to $\hat{f}_{m,n}$ as the *orthogonal series estimator of approximation order m* .

Let us make the following assumption under which the orthogonal series estimator makes sense.

Assumption 4.1. Let $(\psi_k)_{k \geq 1}$ denote a complete orthonormal basis of \mathbb{H} . There are functions g_k such that the φ_k defined by (4.3) are linearly independent and there exist coefficients $Q_{k,l}$ such that $\psi_k = \sum_{j=1}^k Q_{k,j} \varphi_j$. Define $V_m \equiv \text{span}(\psi_1, \dots, \psi_m)$ for all $m \geq 1$.

Under this assumption, the sequence of subspaces V_m is monotone with $V_m \subset V_{m+1}$ and $V_m \neq V_{m+1}$ for all m . As $V_m = \text{span}(\psi_1, \dots, \psi_m) = \text{span}(\varphi_1, \dots, \varphi_m)$, the orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ belongs to V_m . Consequently, if f does not lie in V_m for a fixed m , then the estimate $\hat{f}_{m,n}$ never perfectly recovers f . Hence, the functions g_k should be carefully chosen, since they determine the subspaces V_m . It is favorable to choose the g_k such that f can be well approximated by functions of the corresponding V_m . Note that it can be impossible to proceed conversely. That means that, if we first fix V_m , then it can occur that there are no adequate functions g_k such that $\text{span}(\varphi_1, \dots, \varphi_m) = V_m$.

However, in all the examples that we consider in the following, we will be able to relate V_m to a polynomial basis, either because the φ_k are polynomials themselves or by exhibiting an isometry transforming φ_k into a polynomial. Formally we assume the following.

Assumption 4.2. There exists an isometry T from \mathbb{H} to $\mathbb{H}' = L^2[a', b']$ such that, for all $k \geq 1$, $T\varphi_k$ is a polynomial of degree $k - 1$. We denote by T^{-1} the inverse isometry.

Under Assumption 4.2 it is clear that the coefficients $Q_{k,l}$ in (4.4) are the coefficients of orthonormal polynomials in \mathbb{H}' .

4.1.2 EXAMPLES

For illustration let us consider some examples of infinite mixtures of scale families. Densities that are supported on $(0, +\infty)$ and that satisfy some monotonicity constraints can be represented as nonparametric mixtures, see for example Balabdaoui & Wellner (2004). We exhibit the orthogonal series estimator in these examples. In Section 4.3 numerical results of the performance of these estimators are presented.

Example 1. Uniform Mixture

Any monotone non-increasing density function h with support in $(0, +\infty)$ can be written as a mixture of uniform densities $U[0, t]$ (Feller, 1971, p. 158). That is, there exists a density function f such that

$$h(x) = \int_0^\infty \frac{1}{t} \mathbb{1}\{x \in (0, t)\} f(t) dt.$$

Here, denote $\pi_t(x) = \frac{1}{t} \mathbb{1}_{[0,t]}(x)$. Choose

$$g_k(x) = kx^{k-1}, \quad k \geq 1.$$

By relation (4.3) we obtain $\varphi_k(t) = t^{k-1}$. Consider densities f that are supported on a bounded interval $[a, b]$. Then orthonormal polynomials in $L^2[a, b]$ can be used to define the orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ of the mixing density f . Namely, let $p_k(t) = \sum_{j=1}^k Q_{k,j} t^{j-1}$ be orthonormal polynomials in \mathbb{H} each of degree $k-1$. Then according to (4.4), the corresponding orthogonal series estimator is given by

$$\hat{f}_{m,n}(t) = \frac{1}{n} \sum_{k,j,l=1}^m \sum_{i=1}^n j Q_{k,j} Q_{k,l} X_i^{j-1} t^{l-1},$$

with $Q_{k,j} = 0$ for all $j > k$ and where X_1, \dots, X_n is an i.i.d. sample from the uniform mixture h .

Example 2. Scale Mixture of Beta Distributions

A k -monotone function h is defined as a non-increasing, convex density function whose derivatives satisfy for all $j = 1, \dots, k-2$ that $(-1)^j h^{(j)}$ is non-negative, non-increasing and convex. Any k -monotone function h can be represented by a scale mixture of Beta distributions $B(1, k)$ (Balabdaoui & Wellner, 2004), that is there exists a density function f such that $h(x) = \int_0^\infty f(t) \pi_t(x) dt$ with

$$\pi_t(x) = \frac{k}{t} \left(1 - \frac{x}{t}\right)^{k-1}, \quad \text{for } x \in [0, t].$$

Take

$$g_p(x) = \frac{x^{p-1}}{k \beta(p, k)}, \quad p \geq 1,$$

where $\beta(a, b) = \int_0^1 t^{a-1} (1-t)^{b-1} dt$ denotes the Beta function. It follows that $\varphi_p(t) = t^{p-1}$. As in the preceding example, if the support of f lies in $[a, b]$ then an orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ of f can be constructed based on orthonormal polynomials $p_k(t) = \sum_{j=1}^k Q_{k,j} t^{j-1}$. In this case the orthogonal series estimator is given by

$$\hat{f}_{m,n}(t) = \frac{1}{n} \sum_{p,j,l=1}^m \sum_{i=1}^n \frac{Q_{p,j} Q_{p,l} X_i^{j-1}}{k \beta(p, k)} t^{l-1}.$$

Example 3 (a). Exponential Mixture

If a density h is k -monotone for all $k \geq 1$, then h is called *completely monotone*. Any completely monotone density h can be written as an infinite mixture of exponential distributions (Balabdaoui & Wellner, 2004). That is, there exists a density function f such that $h(x) = \int_0^\infty f(t) \pi_t(x) dt$ with $\pi_t(x) = te^{-tx}$.

For the orthogonal series estimator let us consider the functions

$$g_k(x) = \mathbb{1} \left\{ x > k - \frac{1}{2} \right\}, \quad k \geq 1.$$

By (4.3), we obtain

$$\varphi_k(t) = e^{-(k-\frac{1}{2})t}.$$

Notice that the φ_k can be transformed into polynomials in some space \mathbb{H}' . Therefore, define the isometry T from $\mathbb{H} = L^2[a, b]$ to $\mathbb{H}' = L^2[e^{-b}, e^{-a}]$ by

$$Tf(t) = f(-\log t)/\sqrt{t}, \quad t \in [e^{-b}, e^{-a}].$$

It follows that $T\varphi_k(t) = t^{k-1}$ are polynomials. Let $p_k(t) = \sum_{j=1}^k Q'_{k,j}t^{j-1}$ be orthonormal polynomials in \mathbb{H}' . Denote by T^{-1} the inverse operator of T given by $T^{-1}h(t) = e^{-t/2}h(e^{-t})$. Since T^{-1} is an isometry, we get that the functions

$$\psi_k \equiv T^{-1}p_k = \sum_{j=1}^k Q'_{k,j}\varphi_j$$

are orthonormal in \mathbb{H} . Consequently, an orthonormal series estimator is given by

$$\hat{f}_{m,n}(t) = \frac{1}{n} \sum_{k,j,l=1}^m \sum_{i=1}^n \mathbb{1} \left\{ X_i > j - \frac{1}{2} \right\} Q'_{k,j} Q'_{k,l} e^{-(l-\frac{1}{2})t}. \quad (4.5)$$

Example 3 (b). Exponential Mixture

The choice of the functions g_k is not unique. For illustration, consider once again exponential mixtures with $\pi_t(x) = te^{-tx}$. This time take

$$g_k(x) = x^k/k! \quad \text{and} \quad \varphi_k(t) = t^{-k}, \quad k \geq 1.$$

To relate φ_k to polynomials, define an isometry S from \mathbb{H} to $\mathbb{H}'' = L^2[1/b, 1/a]$ by $Sf(t) = \frac{1}{t}f(\frac{1}{t})$. We have $S\varphi_k(t) = t^{k-1}$ for all $k \geq 1$. Furthermore, denote by S^{-1} the inverse of S satisfying $S^{-1}h = \frac{1}{t}h(\frac{1}{t})$. Let $p_k(t) = \sum_{j=1}^k Q''_{k,j}t^{j-1}$ be orthonormal polynomials in \mathbb{H}'' of degree $k-1$. Since S^{-1} is an isometry,

$$\psi_k \equiv S^{-1}p_k = \sum_{j=1}^k Q''_{k,j}\varphi_j$$

are orthonormal functions in \mathbb{H} and the orthonormal series estimator is given by

$$\hat{f}_{m,n}(t) = \frac{1}{n} \sum_{k,j,l=1}^m \sum_{i=1}^n \frac{Q''_{k,j} Q''_{k,l} X_i^j}{j!} t^{-l}.$$

4.2 ANALYSIS OF THE ORTHOGONAL SERIES ESTIMATOR

In this section the properties of the orthogonal series estimator are analyzed. First, we compute the bias and the variance of $\hat{f}_{m,n}$. Then upper and lower bounds of the mean integrated squared error (MISE) are developed. Finally, we will show that in the case of an exponential mixture, the orthogonal series estimator defined by (4.5) achieves the minimax rate in some specific smooth spaces.

4.2.1 BIAS, VARIANCE AND MISE

It is useful to write the orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ defined in (4.4) in matrix notation. Therefore, we introduce the $m \times m$ -matrix $Q = (Q_{k,j})_{k,j}$, where $Q_{k,j} = 0$ for all $j > k$, and the m -vectors

$$\begin{aligned}\Phi &= (\varphi_1, \dots, \varphi_m)^T, & \Psi &= (\psi_1, \dots, \psi_m)^T = Q\Phi, \\ \mathbf{g}(x) &= (g_1(x), \dots, g_m(x))^T, & \hat{\mathbf{g}} &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbf{g}(X_i), \\ \alpha &= (\alpha_1, \dots, \alpha_m)^T = \langle \Psi, f \rangle_H^T, & \hat{\alpha} &= (\hat{\alpha}_1, \dots, \hat{\alpha}_m)^T = Q\hat{\mathbf{g}}.\end{aligned}$$

It follows that

$$\hat{f}_{m,n} = \hat{\alpha}^T \Psi = \hat{\mathbf{g}}^T Q^T Q \Phi.$$

Further, let $\Sigma = \mathbb{E}[(\mathbf{g}(X) - \mathbb{E}[\mathbf{g}(X)])(\mathbf{g}(X) - \mathbb{E}[\mathbf{g}(X)])^T]$ be the covariance matrix of $\mathbf{g}(X)$. The MISE is defined by $\mathbb{E} \left\| \hat{f}_{m,n} - f \right\|_H^2$. The orthogonal projection of f on $V_m = \text{span}(\psi_1, \dots, \psi_m) = \text{span}(\varphi_1, \dots, \varphi_m)$ is denoted by

$$P_{V_m} f = \alpha^T \Psi = \sum_{k=1}^m \langle f, \psi_k \rangle_H \psi_k.$$

It is clear that the orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ is an unbiased estimator of $P_{V_m} f$. Furthermore, by the usual argument, the MISE is decomposed into two terms representing the integrated variance and integrated squared bias. The latter only depends on how well $P_{V_m} f$ approximates f , which depends on the smoothness class to which the density f belongs.

Proposition 4.1. *The orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ defined in (4.4) satisfies*

- (i) For every $t \in [a, b]$, $\mathbb{E}[\hat{f}_{m,n}(t)] = P_{V_m} f(t)$.
- (ii) For every $t \in [a, b]$, $\text{Var}(\hat{f}_{m,n}(t)) = \frac{1}{n} \Psi^T(t) Q \Sigma Q^T \Psi(t)$.
- (iii) $\mathbb{E} \left\| \hat{f}_{m,n} - f \right\|_H^2 = \|P_{V_m} f - f\|_H^2 + \frac{1}{n} \int_a^b \text{Var}(\hat{f}_{m,1}(t)) dt$.

The proof of the proposition is deferred to the end of the chapter in Section 4.6, where the proofs of all the results of this chapter are detailed.

An important issue for orthogonal series estimators $\hat{f}_{m,n}$ is the choice of the approximation order m . The stability of solving $\pi_f(x) = \int \pi_t(x) f(t) dt$ is controlled by choosing m to be small relative to n . As m increases the bias of the estimate f will decrease but the variance will increase. More precisely, as $\hat{f}_{m,n}$ is an unbiased estimator of the orthogonal projection of f in V_m and $V_m \subset V_{m+1}$, a rather large m diminishes the bias. However, the number of coefficients α_k that have to be estimated in (4.2) increases with m . Hence, a large value of m entails a larger variance of the estimator.

Indeed, a common assumption in nonparametric density estimation is to suppose that the orthonormal sequence $(\psi_k)_{k \geq 1}$ is adequate to approximate the mixing density f by its orthogonal

projection on V_m . To be more precise, define for any positive decreasing sequence $\mathbf{u} = (u_m)_m$ and positive number C , the function class

$$\mathcal{C}(\mathbf{u}, C) = \{f \in \mathbb{H} : \|P_{V_m} f - f\|_H \leq C u_m \text{ for all } m \geq 1\}. \quad (4.6)$$

Furthermore, denote the set of densities in \mathbb{H} by $\mathbb{H}_1 \equiv \{f \in \mathbb{H} : f \geq 0, \int_a^b f(t)dt = 1\}$. We will suppose that $f \in \mathcal{C}(\mathbf{u}, C) \cap \mathbb{H}_1$.

4.2.2 UPPER BOUND OF THE MISE

We now provide an upper bound of the MISE for the orthogonal series estimator based on Legendre polynomials. That means that the entries of the matrix Q are the coefficients of the normalized Legendre polynomials $\sum_{j=1}^k Q_{k,j} t^{j-1}$.

Let us briefly recall the definition of the Legendre polynomials in $L^2[a, b]$ denoted by $r_k(t) = \sum_{l=1}^k R_{k,l} t^{l-1}$. Define $\mu = (a + b)/2$ and $\delta = (b - a)/2$. Further, denote $\beta_1 = 2\delta$ and $\beta_k = \delta^2(k - 1)^2 / (4(k - 1)^2 - 1)$ for $k \geq 2$. Then the coefficient $R_{k,l}$ are given by the following recurrence relation

$$R_{k+1,l} = R_{k,l-1} + \mu R_{k,l} - \beta_k R_{k-1,l}, \quad \text{for all } k, l \geq 1,$$

with $R_{1,1} = 1$ and $R_{k,l} = 0$ for all $l > k$. The norm of the Legendre polynomials is given by $\|r_k\| = \sqrt{\beta_1 \dots \beta_k}$. Hence, the coefficients of the orthonormal polynomials are given by

$$Q_{k,l} = \frac{R_{k,l}}{\sqrt{\beta_1 \dots \beta_k}}, \quad \text{for all } k, l \geq 1. \quad (4.7)$$

To show an upper bound of the MISE we use the following property (see Roueff & Ryden, 2005, Lemma A.1). If $\lambda > \frac{2+a+b}{b-a} + \sqrt{1 + \frac{2+a+b}{b-a}}$, then the coefficients of the normalized Legendre polynomials in $L^2[a, b]$ defined by (4.7) verify, as $k \rightarrow \infty$,

$$\sum_{l=1}^k Q_{k,l}^2 = O(\lambda^{2k}). \quad (4.8)$$

Lemma 4.2. *Let the coefficients $Q_{k,j}$ of the orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ defined in (4.4) be the coefficients of the normalized Legendre polynomials in some space $L^2[a', b']$ given by (4.7). Let $\lambda > \frac{2+a'+b'}{b'-a'} + \sqrt{1 + \frac{2+a'+b'}{b'-a'}}$. If the variances $\text{Var}(g_k(X))$ are bounded by a common constant C_0 for all $k \geq 1$, then*

$$\int_a^b \text{Var}(\hat{f}_{m,1}(t))dt = O(\lambda^{2m}), \quad \text{as } m \rightarrow \infty.$$

By combining Proposition 4.1 (iii) and Lemma 4.2 we obtain the following upper bound of the MISE.

Theorem 4.3. *Let the coefficients $Q_{k,j}$ of the orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ defined in (4.4) be the coefficients of the normalized Legendre polynomials in some space $L^2[a', b']$ given by (4.7).*

Define the sequence $\mathbf{u} = (u_m)_m$ by $u_m = m^{-\alpha}$, for all $m \geq 1$ for some $\alpha \geq 1$. Suppose that there is a constant $C_0 > 0$ such that

$$\text{Var}_f(g_k(X)) < C_0 \quad \text{for all } f \in \mathcal{C}(\mathbf{u}, C) \cap \mathbb{H}_1, k \geq 1. \quad (4.9)$$

If $m_n = A \log n$ with $A < 1/(2 \log \lambda)$ with $\lambda > \frac{2+a'+b'}{b'-a'} + \sqrt{1 + \frac{2+a'+b'}{b'-a'}}$, then, as $n \rightarrow \infty$,

$$\sup_{f \in \mathcal{C}(\mathbf{u}, C) \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \left\| \hat{f}_{m_n, n} - f \right\|_H^2 \leq C^2 m_n^{-2\alpha} (1 + o(1)).$$

Remark 4.4. Condition (4.9) is often easily verified. For example, for the exponential mixture of Example 3(a) we obtain that for any density $f \in \mathbb{H}_1$ and any $g_k(x) = \mathbb{1}\{x > k - \frac{1}{2}\}$

$$\text{Var}_f(g_k(X)) \leq \mathbb{E}[g_k^2(X)] = \mathbb{E}[g_k(X)] \leq 1.$$

Similarly, we verify for the Beta mixtures and the g_p of Example 2 that

$$\begin{aligned} \text{Var}_f(g_p(X)) &\leq \mathbb{E}[g_p^2(X)] = \frac{1}{k(\beta(p, k))^2} \int_a^b f(t) \int_0^t \frac{x^{2p-2}}{t} \left(1 - \frac{x}{t}\right)^{k-1} dx dt \\ &= \frac{\beta(2p-1, k)}{k(\beta(p, k))^2} \int_a^b f(t) t^{2p-2} dt \leq \frac{b^{2p-2}}{(\Gamma(p))^2 \Gamma(k)}. \end{aligned}$$

Hence, $\text{Var}_f(g_p(X))$ is bounded by a common constant for all $p \geq 1$. In the setting of uniform mixtures where $g_k(x) = kx^{k-1}$ (Example 1), we have

$$\text{Var}_f(g_k(X)) \leq \mathbb{E}[g_k^2(X)] = \int_a^b \int_0^t \frac{k^2}{t} x^{2k-2} dx f(t) dt = \frac{k^2}{2k-1} \int_a^b t^{2k-2} f(t) dt \leq \frac{k^2 b^{2k-2}}{2k-1}.$$

Then (4.9) holds, if $b < 1$. Hence, Theorem 4.3 applies in these examples if the orthogonal series estimator $\hat{f}_{m, n}$ is based on Legendre polynomials.

4.2.3 LOWER BOUNDS OF THE MINIMAX RISK

Our goal is to find a lower bound of the minimax risk

$$\inf_{\hat{f} \in \mathcal{S}_n} \sup_{f \in \mathcal{C}} \mathbb{E}_f \|f - \hat{f}\|_H^2,$$

where \mathcal{S}_n is the set of all estimators based on X_1, \dots, X_n with values in \mathbb{H} and \mathcal{C} denotes a subset of densities in \mathbb{H}_1 .

For any function $f \in \mathbb{H}$ we define the function $\pi_f(x) = \int f(t) \pi_t(x) dt$ on \mathbb{R}_+ . Note that if $f \in \mathbb{H}_1$ is a density, then π_f is a mixture density with mixing density f . We use the functional analysis notation $\pi_f h$ to denote the integral $\int h(x) \pi_f(x) dx$. Furthermore, the joint density of the sample (X_1, \dots, X_n) is denoted by $\pi_f^{\otimes n}$.

We now present a general lower bound for the minimax risk.

Theorem 4.5 (Lower bound). *Let \mathcal{C} be a subset of functions in \mathbb{H} and let f_0 be in \mathbb{H}_1 . For any function $f_* \in \mathcal{C}$ with $\|f_*\|_H \leq 1$ and $f_0 \pm f_* \in \mathbb{H}_1$ the following lower bound holds, for any $c \in (0, 1)$,*

$$\inf_{\hat{f} \in \mathcal{S}_n} \sup_{f \in \{f_0 + \mathcal{C}\} \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \|f - \hat{f}\|_H^2 \geq c \|f_*\|_H^2 - \frac{c}{(1-c)^2} \left(\left(1 + \int |\pi_{f_*}(x)| dx\right)^n - 1 \right). \quad (4.10)$$

For a more specific set \mathcal{C} we can derive an alternative lower bound by applying the van Trees inequality (Gill & Levit, 1995).

Define the following function class for any positive decreasing sequence $\mathbf{u} = (u_m)_m$ and any positive numbers C and K

$$\mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C) = \{f \in \mathcal{C}(\mathbf{u}, C) : \|f\|_{\infty, f_0} \leq K\}, \quad (4.11)$$

where f_0 is a fixed function in $\mathbb{H}_+ \equiv \{f \in \mathbb{H} : f \geq 0\}$ and $\|\cdot\|_{\infty, f_0}$ is defined as the following semi-norm on \mathbb{H}

$$\|f\|_{\infty, f_0} = \operatorname{ess\,sup}_{t \in \Theta} \frac{|f(t)|}{f_0(t)},$$

with the convention $0/0 = 0$ and $s/0 = \infty$ for $s > 0$. Further, for any subspace V of \mathbb{H} introduce,

$$K_{\infty, f_0}(V) = \sup\{\|f\|_{\infty, f_0} : f \in V, \|f\|_H = 1\}.$$

Theorem 4.6 (Lower bound by van Trees). *Let λ be a probability density on $[-1, 1]$ satisfying the conditions of the van Trees inequality in (Gill & Levit, 1995). Denote the Fisher information of λ by*

$$I(\lambda) = \mathbb{E}_\lambda \left[\left(\frac{\partial}{\partial \alpha} \log \lambda(\alpha) \right)^2 \right].$$

Let f_0 be in \mathbb{H}_1 and let $K < 1$. For any $f_* \in \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C)$ such that $f_0 \pm f_* \in \mathbb{H}_1$ the following lower bound holds

$$\inf_{\hat{f} \in \mathcal{S}_n} \sup_{f \in \{f_0 + \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C)\} \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \|f - \hat{f}\|_H^2 \geq \frac{\|f_*\|_H^2}{\frac{K}{1-K} n \int_0^\infty |\pi_{f_*}(x)| dx + I(\lambda)}.$$

We see that both lower bounds of Theorem 4.5 and 4.6 involve the same terms, namely $\|f_*\|_H$ and $\int_0^\infty |\pi_{f_*}(x)| dx$. In an asymptotic study of the lower bound, the function f_* will depend on n , say $f_{*,n}$, and both terms $\|f_{*,n}\|_H$ and $\int_0^\infty |\pi_{f_{*,n}}(x)| dx$ need to be controlled as n tends to infinity.

We first derive a lower bound of the norm of $f_{*,n}$ on the set $\{f_0 + \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C)\} \cap \mathbb{H}_1$.

Lemma 4.7. *Suppose that Assumption 4.1 holds. Let f_0 be in \mathbb{H}_1 . If $K \leq 1$, then*

$$\sup\{\|f\|_H : f \in \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C), f_0 \pm f \in \mathbb{H}_1\} \geq (Cu_{m+1}) \wedge \frac{K}{K_{\infty, f_0}(V_{m+2} \cap V_m^\perp)}.$$

Under Assumption 4.2, where the orthonormal functions ψ_k are related to polynomials in some space $\mathbb{H}' = L^2[a', b']$, the constant $K_{\infty, f_0}(V_{m+2} \cap V_m^\perp)$ can be bounded.

Lemma 4.8. *Suppose that Assumption 4.2 holds. Let f_0 be in \mathbb{H}_1 and suppose that Tf_0 is bounded away from 0, that is $Tf_0(t) \geq c > 0$ for all t . Moreover, assume that there exists a positive real number B such that for all $f \in \mathbb{H}$*

$$\|f\|_{\infty, f_0} \leq B \|Tf\|_{\infty, Tf_0}. \quad (4.12)$$

Then there exists a constant $C_0 > 0$ satisfying

$$K_{\infty, f_0}(V_{m+2} \cap V_m^\perp) \leq C_0 m, \quad \text{for all } m \geq 1.$$

Remark 4.9. If the sequence $\mathbf{u} = (u_m)_m$ is defined by $u_m = m^{-\alpha}$ for some $\alpha \geq 1$ and $K \leq 1$, then under the conditions of Lemma 4.8 we obtain together with Lemma 4.7 that

$$\sup\{\|f\|_H : f \in \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C), f_0 \pm f \in \mathbb{H}_1\} \geq \frac{C}{(m+1)^\alpha} \wedge \frac{K}{C_0 m} \geq \frac{C_1}{(m+1)^\alpha},$$

for m sufficiently large and some constant C_1 . If $\alpha > 1$, then $C_1 = C$.

4.2.4 MINIMAX RATE FOR EXPONENTIAL MIXTURES

In this section, we show that in the case of exponential mixtures the orthogonal series estimator of Example 3(a) achieves the minimax rate. We study the minimax rate for estimating f in the space $\mathcal{C}(\mathbf{u}, C) \cap \mathbb{H}_1$ with $u_m = m^{-\alpha}$ for $m \geq 1$ and some $\alpha \geq 1$.

Theorem 4.10. *Consider the exponential case where $\pi_t(x) = te^{-tx}$ for $x > 0$ and $t \in \Theta = [a, b]$ with $0 \leq a < b$ and $\mathbb{H} = L^2[a, b]$. Let $g_k(x) = \mathbb{1}\{x > k - \frac{1}{2}\}$, for $k \geq 1$ and define φ_k and V_m accordingly. Define $u_n = m_n^{-\alpha}$ for $n \geq 1$ and some $\alpha \geq 1$ and the function space $\mathcal{C}(\mathbf{u}, C)$ as in (4.6). Then the following assertions hold.*

- (i) Let $m_n = A \log n$ with $A < (2 \log(\frac{2+a'+b'}{b'-a'} + \sqrt{1 + \frac{2+a'+b'}{b'-a'}}))^{-1}$ where $a' = e^{-b}$ and $b' = e^{-a}$. Define

$$\hat{f}_n(t) = \frac{1}{n} \sum_{k,j,l=1}^{m_n} \sum_{i=1}^n g_j(X_i) Q_{k,j} Q_{k,l} e^{-(l-\frac{1}{2})t},$$

where the $Q_{k,j}$ are the coefficients of the orthonormal Legendre polynomials in $\mathbb{H}' = L^2[a', b']$ defined by (4.7). Then

$$\sup_{f \in \mathcal{C}(\mathbf{u}, C) \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \left\| \hat{f}_n - f \right\|_H^2 \leq C^2 A^{-2\alpha} (\log n)^{-2\alpha} (1 + o(1)).$$

- (ii) There is $C^* > 0$ such that

$$\inf_{\hat{f} \in \mathcal{S}_n} \sup_{f \in \mathcal{C}(\mathbf{u}, C) \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \|f - \hat{f}\|_H^2 \geq C^* (\log n)^{-2\alpha} (1 + o(1)). \quad (4.13)$$

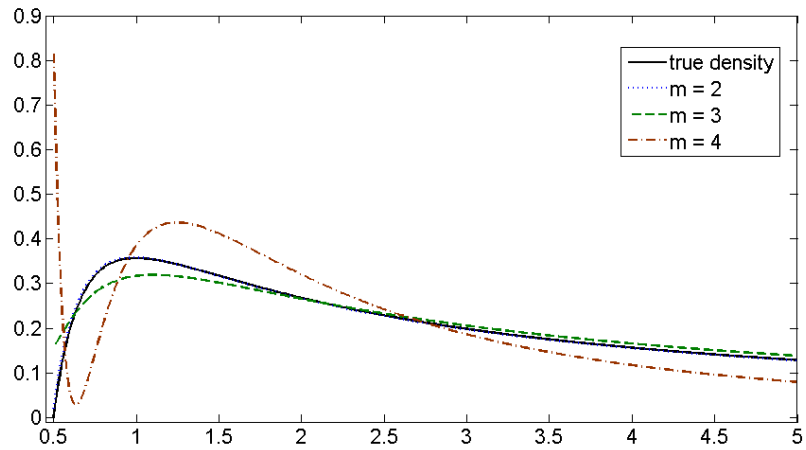
If $\alpha > 1$, then $C^* = C^2 D^{-2\alpha}$ where $D > -1/\log(b' \vee (1 - a'))$.

4.3 NUMERICAL STUDY

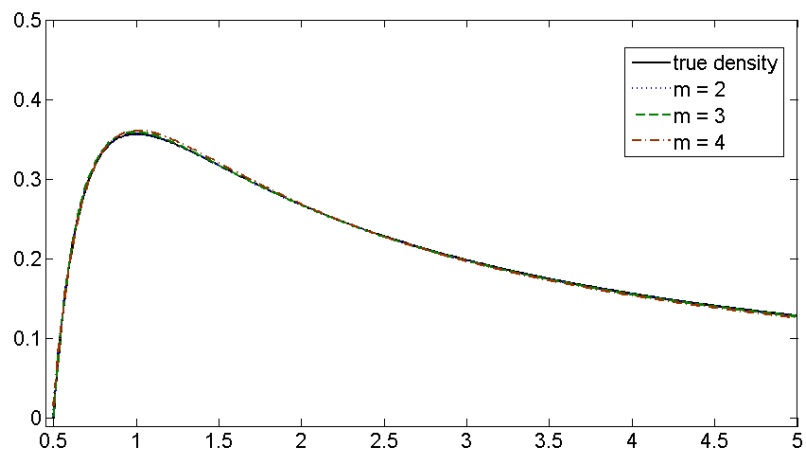
A simulation study shows that the new orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ is an accurate estimator if the number of observations is large and if the approximation order m is well chosen. We carried out simulations for the estimators of Subsection 4.1.2.

Figure 4.1 illustrates the influence of the approximation order m on the estimate. Here the estimator of Example 3(b) is considered, that is observations are distributed according to an infinite exponential mixture. The true mixing density f belongs to $V_2 = \text{span}(t^{-1}, t^{-2})$. The orthogonal series estimator is evaluated on a fixed sample with different approximation orders $m = 2, 3$ and 4. We observe that in Figure 4.1 a) the estimation is nearly perfect for $m = 2$. However, for larger m the estimation becomes worse. This is due to the higher variance of $\hat{f}_{m,n}$ for larger values of m . In Figure 4.1 b) the same estimates are carried out on a larger sample, and this time all estimates coincide with the true mixing density. Thus, the approximation order m must be carefully chosen with respect to the number of observations n .

Figure 4.2 shows the same effect for a scale mixture of Beta distributions $B(1, 2)$ as described in Example 2. Here the mixing density f is a polynomial of degree 4, that is f lies in V_5 . For the

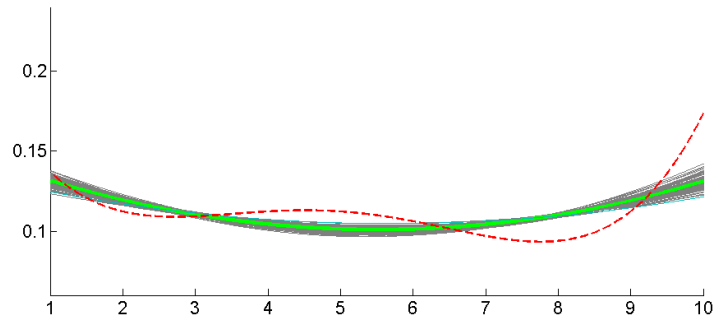


a) 10^5 observations

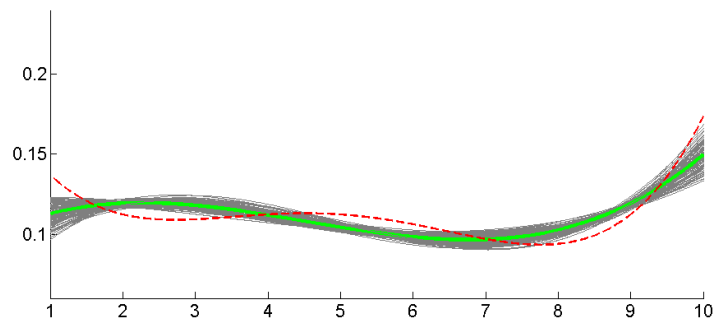


b) 10^6 observations

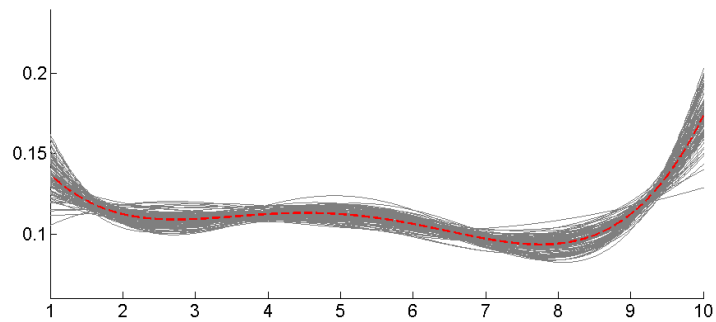
Figure 4.1: Estimate of the mixing density of an exponential mixture with different m and different numbers of observations (Example 3(b)).



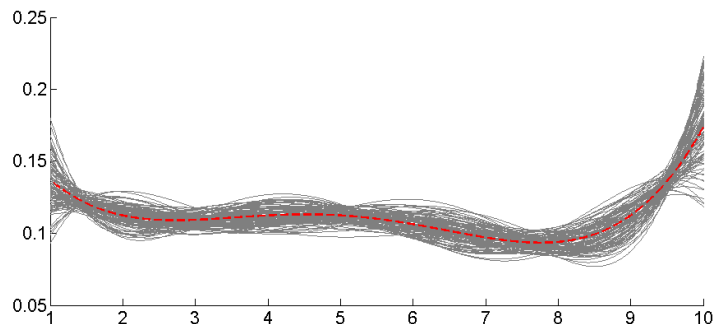
a) $m = 3$



b) $m = 4$



c) $m = 5$



d) $m = 6$

Figure 4.2: Estimate of the mixing density f (red dashed line) of a beta mixture (Example 2). Estimators are represented by gray solid lines. In a) and b) the orthogonal projection of f on V_m is depicted by a green solid line.

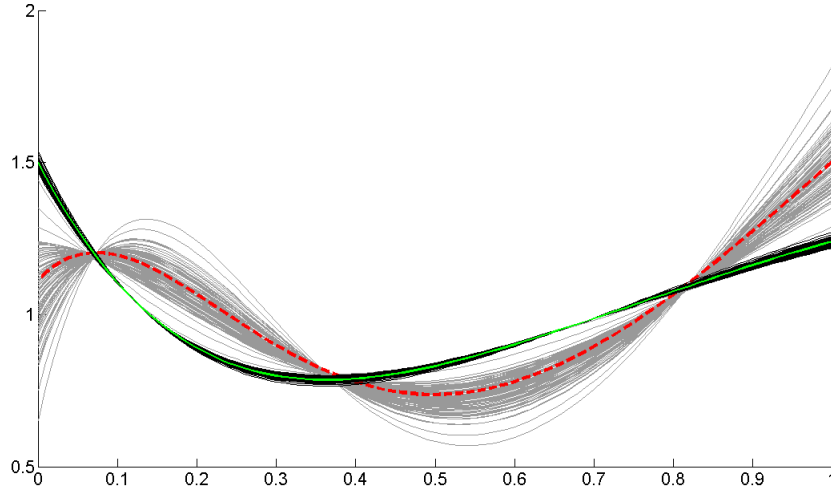


Figure 4.3: Estimator of the mixing density f from an exponential mixture (Example 3(a)). The mixing density f (red dashed line) belongs to V_4 . Gray lines represent 100 estimates with $m = 4$, black lines are estimates on the same samples with $m = 3$. The green line is the projection of f on V_3 .

Table 4.1: Estimated coefficients $\gamma_k^{(m)}$ of the mixing density f in the simulations of Figure 4.3. Denote $f = \sum_{k=1}^4 \gamma_k^{(4)} \varphi_k$ and $P_{V_3} f = \sum_{k=1}^3 \gamma_k^{(3)} \varphi_k$

| $m = 4$ | $\gamma_1^{(4)}$ | $\gamma_2^{(4)}$ | $\gamma_3^{(4)}$ | $\gamma_4^{(4)}$ |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| true values | 14.4580 | -55.6077 | 74.5143 | -32.2525 |
| mean | 14.8561 | -57.5015 | 77.3730 | -33.6310 |
| variance | 10.2205 | 232.1123 | 530.4988 | 123.6879 |
| var-to-mean ratio | 0.6880 | -4.0366 | 6.8564 | -3.6778 |

| $m = 3$ | $\gamma_1^{(3)}$ | $\gamma_2^{(3)}$ | $\gamma_3^{(3)}$ |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| true values | 5.4616 | -12.2802 | 8.3381 |
| mean | 5.4693 | -12.3053 | 8.3569 |
| variance | 0.0107 | 0.1027 | 0.0533 |
| var-to-mean ratio | 0.0020 | -0.0083 | 0.0064 |

approximation orders m from 3 to 6 estimation was carried out on 100 samples of size 10^5 . One can see from the plots that the variance of the estimate increases with the approximation order, whereas the bias decreases. Note that in the simulations a) and b) the estimates are very close to the orthogonal projection on V_m . This confirms that the orthogonal series estimator is an unbiased estimator of $P_{V_m}f$, see Proposition 4.1.

Finally Figure 4.3 and Table 4.1 show simulation results for the estimator of Example 3(a). The mixing density f lies in $V_4 = \text{span}(e^{-t/2}, \dots, e^{-7t/2})$ and the corrected orthogonal series estimator is displayed for 100 samples of size 10^7 with two different approximation orders $m = 3$ and 4. Once again we observe that the variance of the estimates increases with the approximation order m . On the other hand, for small m the bias is larger. Table 4.1 displays the estimates of the coefficients $\gamma_k^{(m)}$ of the expansion $P_{V_m}f = \sum_{k=1}^m \gamma_k^{(m)} \varphi_k$, more precisely the empirical bias, variance and variance-to-mean ration are presented. We observe that the estimated coefficients are quite close to the true values. Moreover, the estimates are more precise for smaller m , that is, they have lower variance.

4.4 ORTHOGONAL SERIES ESTIMATOR IN THE PILE-UP MODEL

The orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}$ defined in (4.4) is based on the fact the coefficients of the orthogonal series expansion can be written as moments from the mixture distribution. Thus, the coefficients can be estimated by the corresponding empirical moments. Using results from Chapter 3, the empirical moments can be replaced by weighted means based on pile-up observations. Numerical results show that the performance of such an estimator is similar to the performance of the $\hat{f}_{m,n}$ defined in (4.4) for infinite mixtures.

4.4.1 ADAPTION TO THE PILE-UP MODEL

Let us now consider the pile-up model defined by (1.2) where the target distribution f_{θ_0} is an infinite mixture distribution. More precisely, let

$$f_{\theta_0} = \int_a^b \pi_t(x) f_*(t) dt ,$$

where $\{\pi_t, t \in [a, b]\}$ denotes a parametric collection of densities and f_* denotes the unknown mixing density which is assumed to be an element of $L^2[a, b]$. As in Section 4.1, the mixing density can be written as

$$f_* = \sum_{k=1}^{\infty} \alpha_k \psi_k ,$$

where $(\psi_k)_k$ denotes a complete orthonormal basis of $L^2[a, b]$. Let the ψ_k be given by

$$\psi_k = \sum_{l=1}^k Q_{k,l} \varphi_l \quad \text{and} \quad \varphi_l(t) = \int_0^{\infty} \pi_t(x) g_l(x) dx ,$$

with known functions g_l . Then $\langle f_*, \psi_k \rangle = \sum_{l=1}^k Q_{k,l} \langle f_*, \varphi_l \rangle = \sum_{l=1}^k Q_{k,l} \mathbb{E}[g_l(Y)]$. Recall from Chapter 3 that under Assumption 3.1 Relation (3.5) holds, that is, for any integrable function h we

have

$$\mathbb{E}_{\theta_0} [h(Y)] = \mathbb{E}_{\theta_0} [w \circ G_{\theta_0}(Z) h(Z)] ,$$

where Y has target distribution F_{θ_0} and Z follows the pile-up distribution G_{θ_0} and the weight function is given by

$$w(u) = \frac{1}{M \circ M^{-1}(1-u)}, \quad u \in [0, 1] .$$

Hence, it follows that

$$\alpha_k = \sum_{l=1}^k Q_{k,l} \mathbb{E}[w \circ G_{\theta_0}(Z) g_l(Z)] .$$

Thus, a natural estimator of the coefficients α_k based on a sample (Z_1, \dots, Z_n) from the pile-up model is given by

$$\hat{\alpha}_k = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w(i/n) \sum_{l=1}^k Q_{k,l} g_l(Z_{(i)}) ,$$

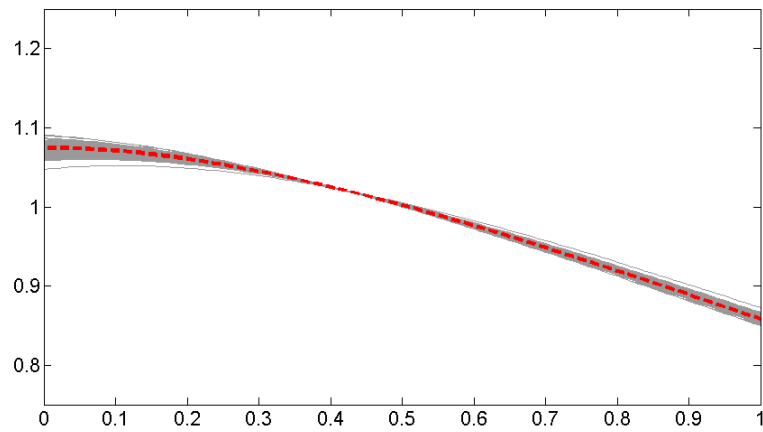
where $Z_{(i)}$ denotes the i -th order statistic. Theorem 3.2 yields that $\hat{\alpha}_k$ are consistent estimators of α_k provided that Assumption 3.1 holds and that $\mathbb{E}[|g_k(Y)|] < \infty$. Thus, the *corrected orthogonal series estimator* is given by

$$\hat{f}_{m,n}^c = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m \sum_{l=1}^m \sum_{j=1}^m w(i/n) Q_{k,j} Q_{k,l} g_l(Z_{(i)}) \varphi_j . \quad (4.14)$$

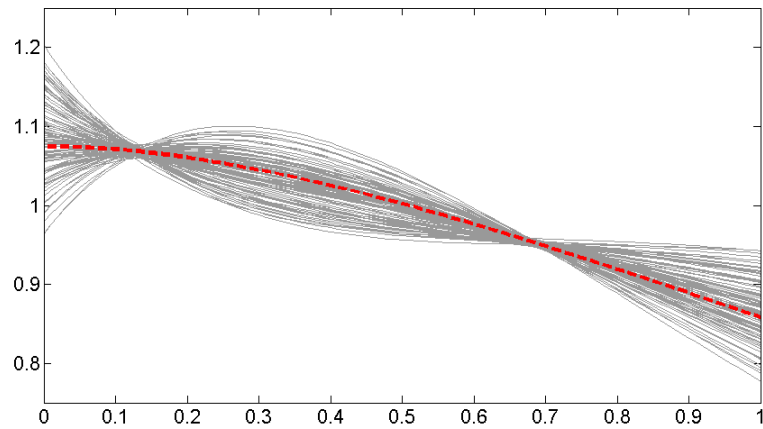
We see that the only formal difference to the estimator $\hat{f}_{m,n}$ defined by (4.4) are the nonnegative weights $w(i/n)$.

4.4.2 NUMERICAL STUDY

In Figure 4.4 we consider the pile-up model where the target distribution is an infinite exponential mixture. The distribution of the number N of variables over which the minimum is evaluated is a Poisson distribution restricted on \mathbb{N}^* given by (1.9) with parameter $\lambda = 1$. Hence, the weights $w_{i,n}$ are given by (3.14). We applied the corrected orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}^c$ defined in (4.14). In this special case $\hat{f}_{m,n}^c$ is obtained from the estimator given in (4.5) where the weights $w(i/n)$ are added. In the simulation the mixing density f_* belongs to V_2 . The estimator $\hat{f}_{m,n}^c$ is evaluated on 100 samples for two different approximation orders, namely $m = 2$ and 3. We can state that $\hat{f}_{m,n}^c$ has the same behavior as $\hat{f}_{m,n}$, namely that the variance depends on the choice of the approximation order m . Furthermore, the estimation is accurate on large samples.



a) $m = 2$



b) $m = 3$

Figure 4.4: Estimate of the mixing density in the pile-up model where the target distribution is an exponential mixture (Example 3(a)).

4.5 DISCUSSION

In this Chapter we have developed an orthogonal series estimator for infinite mixtures of scale distributions. Lower and upper bounds for the mean integrated squared error are provided. In the special case of an exponential mixture, the orthogonal series estimator achieves the minimax rate. The rate of convergence is very slow which confirms that the estimation of the mixing density of an infinite mixture is an ill-posed problem.

In the exponential case, power series expansions of $T\pi_t$ are used to derive the convergence of the term $\int |\pi_{f^*,n}(x)|dx$. This argument cannot be applied in the case of scale mixtures of uniform or beta distributions, because the support of π_t will depend on the scale parameter t . For these cases different techniques are required. Nevertheless, the numerical study assesses the performance of the orthogonal series estimator for different distribution families $\{\pi_t, t \in \Theta\}$. The estimation is accurate, but the approximation order m must be selected carefully.

Moreover, the orthogonal series estimator is easily extended to the pile-up model by replacing empirical means with weighted means, that is with L -statistics. Again, simulations confirm that the estimation is accurate. However, the theoretical results should be revisited. For example, the corrected orthogonal series estimator $\hat{f}_{m,n}^c$ is now only asymptotically unbiased for $P_{V_m}f$. Nevertheless, under appropriate assumptions, the same bounds of the MISE shall be true.

It might be possible to improve the estimator by a more sophisticated selection of the coefficients. That is, using automatically the first m coefficients α_k of the expansion $f = \sum_k \alpha_k \psi_k$ has the drawback that the numeration of the basis $(\psi_k)_{k \geq 1}$ is relevant. Alternatively, one could first compute the estimates $\hat{\alpha}_k$ for a large number of k and then chose the relevant coefficients according to some criteria. For example, only coefficients $\hat{\alpha}_k$ are considered that exceed some fixed threshold, or the $\hat{\alpha}_k$ are ordered by their absolute values to select the m largest values.

4.6 PROOFS

PROOF OF PROPOSITION 4.1

(i) Clear, since $\mathbb{E}[\hat{\alpha}] = \alpha$.

(ii) For the variance we find

$$\text{Var}(\hat{f}_{m,n}(t)) = \mathbb{E}[\hat{f}_{m,n}(t)^2] - \mathbb{E}[\hat{f}_{m,n}(t)]^2 = \Psi(t)^T Q \mathbb{E}[\hat{\mathbf{g}}\hat{\mathbf{g}}^T] Q^T \Psi(t) - (P_{V_m} f)^2.$$

We see that

$$\mathbb{E}[\hat{\mathbf{g}}\hat{\mathbf{g}}^T] = \frac{1}{n} \mathbb{E}[\mathbf{g}(X)\mathbf{g}(X)^T] + \frac{n-1}{n} \mathbb{E}[\mathbf{g}(X)]\mathbb{E}[\mathbf{g}(X)^T] = \frac{1}{n} \Sigma + \langle \Phi, f \rangle \langle \Phi^T, f \rangle$$

and $\Psi^T Q \langle \Phi, f \rangle = \Psi^T \langle \Psi, f \rangle = P_{V_m} f$. This implies (ii).

(iii) By the Pythagorean theorem

$$\|\hat{f}_{m,n} - f\|_H^2 = \|\hat{f}_{m,n} - P_{V_m} f\|_H^2 + \|P_{V_m} f - f\|_H^2.$$

Moreover, by Fubini's theorem

$$\begin{aligned} \mathbb{E}\|\hat{f}_{m,n} - P_{V_m} f\|_H^2 &= \int_a^b \text{Var}(\hat{f}_{m,n}(t)) dt \\ &= \frac{1}{n} \int_a^b \Psi(t)^T Q \Sigma Q^T \Psi(t) dt \\ &= \frac{1}{n} \int_a^b \text{Var}(\hat{f}_{m,1}(t)) dt. \end{aligned}$$

This concludes the proof.

PROOF OF LEMMA 4.2

Note that from the condition that all variances $\text{Var}(g_k(X))$ are bounded by a common constant C_0 it follows by the Cauchy-Schwarz inequality that all covariances $\Sigma_{k,l} = \text{Cov}(g_k(X), g_l(X))$ are bounded by C_0 . By Proposition 4.1 and by linearity of the trace, we obtain

$$\begin{aligned} \int_a^b \text{Var}(\hat{f}_{m,1}(t)) dt &= \int_a^b \text{tr}(\Psi^T(t) Q \Sigma Q^T \Psi(t)) dt = \text{tr}\left(Q \Sigma Q^T \int_a^b \Psi(t) \Psi^T(t) dt\right) \\ &= \text{tr}(Q \Sigma Q^T) = \sum_{k=1}^m \sum_{j=1}^m \sum_{l=1}^m Q_{k,j} Q_{k,l} \Sigma_{j,l} \\ &\leq K_1 \sum_{k=1}^m \left(\sum_{j=1}^m |Q_{k,j}| \right)^2 \leq 2K_1 \sum_{k=1}^m \sum_{j=1}^m |Q_{k,j}|^2 \\ &\leq 2K_1 \sum_{k=1}^m \lambda^{2k} \leq K_2 \lambda^{2m}, \end{aligned}$$

where the first inequality comes from (4.8) and K_1, K_2 are positive numbers.

PROOF OF THEOREM 4.3

It follows by the decomposition of the MISE in Proposition 4.1 (iii) that

$$\begin{aligned} \sup_{f \in \mathcal{C}(\mathbf{u}, \mathcal{C}) \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \left\| \hat{f}_{m_n, n} - f \right\|_H^2 &\leq C^2 m_n^{-2\alpha} + K_2 n^{-1} \lambda^{2m_n} \\ &\leq C^2 m_n^{-2\alpha} \left(1 + \frac{K_2}{C^2} n^{-1} m_n^{2\alpha} \lambda^{2m_n} \right). \end{aligned}$$

Now we have for $m_n = A \log n$ that

$$n^{-1} m_n^{2\alpha} \lambda^{2m_n} = A^{2\alpha} (\log n)^{2\alpha} n^{2A \log \lambda - 1} = o(1),$$

since $A < 1/(2 \log \lambda)$. This concludes the proof.

PROOF OF THEOREM 4.5

Let f_* be as in the Proposition. For a fixed $\hat{f} \in \mathcal{S}_n$ and any $c \in (0, 1)$, define $A = \{\|f_0 - \hat{f}\|_H \leq \frac{c}{1-c}\}$. Then

$$\begin{aligned} \sup_{f \in \{f_0 + \mathcal{C}\} \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \|f - \hat{f}\|_H^2 &= \sup_{f \in \{f_0 + \mathcal{C}\} \cap \mathbb{H}_1} \pi_f^{\otimes n} \|f - \hat{f}\|_H^2 \\ &\geq \frac{c}{2} \pi_{f_0 + f_*}^{\otimes n} \|f_0 + f_* - \hat{f}\|_H^2 + \frac{c}{2} \pi_{f_0 - f_*}^{\otimes n} \|f_0 - f_* - \hat{f}\|_H^2 + (1-c) \pi_{f_0}^{\otimes n} \|f_0 - \hat{f}\|_H^2 \\ &\geq \frac{c}{2} \pi_{f_0 + f_*}^{\otimes n} \left[\mathbb{1}_A \|f_0 + f_* - \hat{f}\|_H^2 \right] + \frac{c}{2} \pi_{f_0 - f_*}^{\otimes n} \left[\mathbb{1}_A \|f_0 - f_* - \hat{f}\|_H^2 \right] + (1-c) \pi_{f_0}^{\otimes n} \|f_0 - \hat{f}\|_H^2 \end{aligned}$$

Note that for a function k defined on \mathbb{R}_+^n we have

$$\begin{aligned} \pi_{f_0 \pm f_*}^{\otimes n} k &= \int k(x_1, \dots, x_n) \prod_{i=1}^n \pi_{f_0 \pm f_*}(x_i) d(x_1, \dots, x_n) \\ &= \int k(x_1, \dots, x_n) \prod_{i=1}^n [\pi_{f_0}(x_i) \pm \pi_{f_*}(x_i)] d(x_1, \dots, x_n) \\ &= \int k(x_1, \dots, x_n) \sum_{I, J} \left[\prod_{i \in I} \pi_{f_0}(x_i) \prod_{j \in J} (-1)^{\#J} \pi_{f_*}(x_j) \right] d(x_1, \dots, x_n), \end{aligned}$$

where the sum is take over all sets I and J such that $I \cup J = \{1, \dots, n\}$ and $I \cap J = \emptyset$. Therefore,

$$\begin{aligned} &\pi_{f_0 + f_*}^{\otimes n} \left[\mathbb{1}_A \|f_0 + f_* - \hat{f}\|_H^2 \right] + \pi_{f_0 - f_*}^{\otimes n} \left[\mathbb{1}_A \|f_0 - f_* - \hat{f}\|_H^2 \right] \\ &= \sum_{I, J} \int \prod_{i \in I} \pi_{f_0}(x_i) \prod_{j \in J} \pi_{f_*}(x_j) \mathbb{1}_A \left[\|f_0 + f_* - \hat{f}\|_H^2 + (-1)^{\#J} \|f_0 - f_* - \hat{f}\|_H^2 \right] d(x_1, \dots, x_n) \end{aligned}$$

Since $\|f_*\|_H \leq 1$ and, on A , $\|f_0 - \hat{f}\|_H \leq \frac{c}{1-c}$, we obtain that, on A , $\|f_0 \pm f_* - \hat{f}\|_H \leq \|f_0 - \hat{f}\|_H + \|f_*\|_H \leq \frac{1}{1-c}$. This implies that the absolute value of the sum in the last display taken over all sets I and J such that the cardinality of set J is positive, $\#J \geq 1$, is lower than

$$\begin{aligned} & \frac{2}{(1-c)^2} \sum_{I, J: \#J \geq 1} \int \prod_{i \in I} \pi_{f_0}(x_i) \prod_{j \in J} |\pi_{f_*}(x_j)| dx_1, \dots, x_n \\ &= \frac{2}{(1-c)^2} \sum_{I, J: \#J \geq 1} \prod_{i \in I} \int \pi_{f_0}(x_i) dx_i \prod_{j \in J} \int |\pi_{f_*}(x_j)| dx_j \\ &= \frac{2}{(1-c)^2} \left\{ \left(1 + \int |\pi_{f_*}(x)| dx \right)^n - 1 \right\} \end{aligned}$$

Moreover, the term with $\#J = 0$ writes

$$\pi_{f_0}^{\otimes n} \left(\mathbb{1}_A (\|f_0 + f_* - \hat{f}\|_H^2 + \|f_0 - f_* - \hat{f}\|_H^2) \right) = 2\pi_{f_0}^{\otimes n} \left(\mathbb{1}_A (\|f_0 - \hat{f}\|_H^2 + \|f_*\|_H^2) \right),$$

by the Parallelogram law. By combining these results, the minimax risk is bounded from below by

$$\begin{aligned} & (1-c)\pi_{f_0}^{\otimes n} \|f_0 - \hat{f}\|_H^2 + c\pi_{f_0}^{\otimes n} \left(\mathbb{1}_A (\|f_0 - \hat{f}\|_H^2 + \|f_*\|_H^2) \right) \\ & \quad - \frac{c}{(1-c)^2} \left(\left(1 + \int |\pi_{f_*}(x)| dx \right)^n - 1 \right) \end{aligned}$$

Finally we see that

$$\begin{aligned} (1-c)\|f_0 - \hat{f}\|_H^2 + c\mathbb{1}_A \left(\|f_0 - \hat{f}\|_H^2 + \|f_*\|_H^2 \right) &= c\mathbb{1}_A \|f_*\|_H^2 + \|f_0 - \hat{f}\|_H^2 ((1-c) + c\mathbb{1}_A) \\ &\geq c\mathbb{1}_A \|f_*\|_H^2 + c\mathbb{1}_{A^c} \\ &\geq c\|f_*\|_H^2, \end{aligned}$$

where we used $1 \geq \|f_*\|_H^2$. This yields the lower bound asserted in the theorem.

PROOF OF THEOREM 4.6

Let f_* be as in the Theorem. Note that for all $\alpha \in [-1, 1]$, the function αf_* belongs to $\mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C)$ and $f_0 \pm \alpha f_* \in \mathbb{H}_1$. For any $\hat{f} \in \mathcal{S}_n$,

$$\begin{aligned} & \sup_{f \in \{f_0 + \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C)\} \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \|f - \hat{f}\|_H^2 \\ & \geq \sup_{\alpha \in [-1, 1]} \mathbb{E}_{f_0 + \alpha f_*} \|f_0 + \alpha f_* - \hat{f}\|_H^2 \\ & \geq \int_{-1}^1 \mathbb{E}_{f_0 + \alpha f_*} \|f_0 + \alpha f_* - \hat{f}\|_H^2 \lambda(\alpha) d\alpha \\ & = \int_a^b \int_{-1}^1 \mathbb{E}_{f_0 + \alpha f_*} \left[\left(f_0(t) + \alpha f_*(t) - \hat{f}_{X_1, \dots, X_n}(t) \right)^2 \right] \lambda(\alpha) d\alpha dt \\ & \geq \int_a^b \frac{(f_*(t))^2}{nI(\alpha) + I(\lambda)} dt \\ & = \frac{\|f_*\|_H^2}{nI(\alpha) + I(\lambda)}, \end{aligned}$$

where the last inequality is the van Trees inequality with the Fisher information

$$I(\alpha) = \mathbb{E}_{f_0 + \alpha f_*} \left[\left(\frac{\partial}{\partial \alpha} \log \pi_{f_0 + \alpha f_*}(X) \right)^2 \right] = \int_0^\infty \frac{(\pi_{f_*}(x))^2}{\pi_{f_0}(x) + \alpha \pi_{f_*}(x)} dx .$$

Note that

$$\begin{aligned} |\pi_{f_*}(x)| &= \left| \int_a^b f_*(t) \pi_t(x) dt \right| \\ &\leq \operatorname{ess\,sup}_{t \in [a, b]} \frac{|f_*(t)|}{f_0(t)} \int_a^b f_0(t) \pi_t(x) dt \\ &= \|f_*\|_{\infty, f_0} \pi_{f_0}(x) \\ &\leq K \pi_{f_0}(x) . \end{aligned}$$

Recall that $K < 1$. Hence,

$$I(\alpha) \leq \int_0^\infty \frac{K \pi_{f_0}(x) |\pi_{f_*}(x)|}{\pi_{f_0}(x) - K \pi_{f_0}(x)} dx = \frac{K}{1 - K} \int_0^\infty |\pi_{f_*}(x)| dx .$$

This completes the proof.

PROOF OF LEMMA 4.7

Let α and β be such that

$$\alpha \int_a^b \psi_{m+1} dt + \beta \int_a^b \psi_{m+2} dt = 0 \quad \text{and} \quad (\alpha^2 + \beta^2)^{1/2} = (Cu_{m+1}) \wedge \frac{K}{K_{\infty, f_0}(V_{m+2} \cap V_m^\perp)} .$$

Define $f_* = \alpha \psi_{m+1} + \beta \psi_{m+2}$. Thus $\int_a^b f_*(t) dt = 0$ and

$$\|f_*\|_H = (Cu_{m+1}) \wedge \frac{K}{K_{\infty, f_0}(V_{m+2} \cap V_m^\perp)} . \quad (4.15)$$

It remains to show that $f_* \in \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C)$ and $f_0 \pm f_* \in \mathbb{H}_1$. To start with we note that f_* lies in V_{m+2} and is orthogonal to V_m . Therefore,

$$\begin{aligned} \|f_* - P_{V_k} f_*\|_H &= \begin{cases} \|f_*\|_H & = (\alpha^2 + \beta^2)^{1/2} \leq Cu_{m+1}, & \text{if } k \leq m \\ \|\beta \psi_{m+2}\|_H & = |\beta| \leq Cu_{m+1}, & \text{if } k = m + 1 \\ 0, & & \text{if } k \geq m + 2 \end{cases} \\ &\leq Cu_k , \end{aligned}$$

since \mathbf{u} is a decreasing sequence. We also see that

$$\|f_*\|_{\infty, f_0} = \|f_*\|_H \operatorname{ess\,sup}_t \frac{|f_*(t)|}{\|f_*\|_H f_0(t)} \leq \|f_*\|_H K_{\infty, f_0}(V_{m+2} \cap V_m^\perp) \leq K ,$$

by relation (4.15). Thus, $f_* \in \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C)$.

By definition of f_* , we have $\int_a^b f_0 \pm f_*(t)dt = 1$. It remains to show that $f_0 \pm f_* \geq 0$. According to Roueff & Ryden (2005), Lemma 1, for all $f \in \mathbb{H}$,

$$\|f\|_{\infty, f_0} = \sup_{g \in \mathbb{H}} \frac{|\langle f, g \rangle_H|}{\langle f_0, |g| \rangle_H}.$$

Thus, for all $g \in \mathbb{H}_+$,

$$\langle f_0 + f_*, g \rangle_H \geq \langle f_0, g \rangle_H (1 - \|f_*\|_{\infty, f_0}) \geq 0,$$

where we have used $K \leq 1$. Taking $g = (f_0 + f_*)_- \equiv -(f_0 + f_*) \vee 0$ yields $-\|(f_0 + f_*)_-\|_H \geq 0$, whence $(f_0 + f_*)_- = 0$ and $f_0 + f_* \in \mathbb{H}_+$. This shows that $f_0 + f_* \in \mathbb{H}_1$. The same arguments hold true for $f_0 - f_*$ and the proof is complete.

PROOF OF LEMMA 4.8

Note that $\{Tf : f \in V_m\}$ is the set of polynomials in \mathbb{H}' of degree at most $m - 1$, denoted by \mathcal{P}_{m-1} . Using $\|f\|_H = \|Tf\|_{H'}$ and by the assumptions, we obtain

$$\begin{aligned} K_{\infty, f_0}(V_m) &= \sup\{\|f\|_{\infty, f_0} : f \in V_m, \|f\|_H = 1\} \\ &\leq B \sup\{\|Tf\|_{\infty, Tf_0} : f \in V_m, \|f\|_H = 1\} \\ &= B \sup\{\|p\|_{\infty, Tf_0} : p \in \mathcal{P}_{m-1}, \|p\|_{H'} = 1\} \\ &= B \sup\left\{ \sup_{t \in [a', b']} \frac{|p(t)|}{Tf_0(t)} : p \in \mathcal{P}_{m-1}, \|p\|_{H'} = 1 \right\} \\ &\leq \frac{B}{c} \sup\left\{ \sup_{t \in [a', b']} |p(t)| : p \in \mathcal{P}_{m-1}, \int_{a'}^{b'} p^2(t)dt = 1 \right\} \end{aligned}$$

By the Nikolskii inequality (see e.g. DeVore & Lorentz (1993), Theorem 4.2.6), there exists a constant $C > 0$ such that

$$\sup\left\{ \sup_{u \in [-1, 1]} |p(u)| : p \in \mathcal{P}_{m-1}, \int_{-1}^1 p^2(t)dt = 1 \right\} \leq Cm.$$

Hence, there exists $C_0 > 0$ such that $K_{\infty, f_0}(V_m) \leq C_0 m$. Finally, as $V_{m+2} \cap V_m^\perp \subset V_{m+2}$, we have $K_{\infty, f_0}(V_{m+2} \cap V_m^\perp) \leq K_{\infty, f_0}(V_{m+2})$, which concludes the proof.

PROOF OF THEOREM 4.10

Assertion (i) holds as we have shown in Remark 4.4.

We will show Assertion (ii) by applying Theorem 4.5. Let $K \leq 1$ and let $f_0 \in \mathbb{H}_1$ satisfying $\|f_0\|_H \leq 1$. Then, for any $f_* \in \mathcal{C}$ with $\|f_*\|_H \leq 1$ and $f_0 \pm f_* \in \mathbb{H}_1$ Relation (4.10) holds.

For the control of the norm of f_* we note that, as $Tf(t) = f(-\log t)/\sqrt{t}$, $\|Tf\|_{\infty, f_0} = \|f\|_{\infty, f_0}$ for all $f \in \mathbb{H}$. That is, (4.12) is an equality with $B = 1$. Then Lemma 4.7 and Lemma 4.8 apply and yield

$$\sup\{\|f\|_H : f \in \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C), f_0 \pm f \in \mathbb{H}_1\} \geq \frac{C}{(m+1)^\alpha} \wedge \frac{K}{C_0 m} \geq \frac{C_1}{(m+1)^\alpha},$$

for some appropriate number $C_1 > 0$ and m sufficiently large.

Next we show that for an appropriate sequence $(f_{*,n})$ in \mathbb{H}_1 that

$$\left(1 + \int_0^\infty |\pi_{f_{*,n}}(x)| dx\right)^n - 1 = o((m_n + 1)^{-2\alpha}), \quad \text{as } n \rightarrow \infty. \quad (4.16)$$

For simplicity in notation we omit the n in $f_{*,n}$ for a moment. For some fixed m , let f_* be in $V_{m+2} \cap V_m^\perp$. Note that

$$\int_0^\infty |\pi_{f_*}(x)| dx = \int_0^\infty |\langle f_*, \pi \cdot(x) \rangle_H| dx = \int_0^\infty |\langle Tf_*, T\pi \cdot(x) \rangle_{H'}| dx.$$

Recall that $Tf(t) = \frac{1}{\sqrt{t}}f(-\log t)$ and that $TV_m = \mathcal{P}_{m-1}$ the set of polynomials of degree at most $m-1$ in \mathbb{H}' . Hence, Tf_* is orthogonal to \mathcal{P}_{m-1} . Denote by $p^{(x)}$ polynomials in \mathcal{P}_{m-1} , for all $x > 0$. Then we have

$$\begin{aligned} \int_0^\infty |\langle Tf_*, T\pi \cdot(x) \rangle_{H'}| dx &= \int_0^\infty |\langle Tf_*, T\pi \cdot(x) - p^{(x)} \rangle_{H'}| dx \\ &\leq \|f_*\|_H \int_0^\infty \|T\pi \cdot(x) - p^{(x)}\|_{H'} dx, \end{aligned}$$

by the Cauchy-Schwarz inequality and since $\|Tf_*\|_{H'} = \|f_*\|_H$. Note that

$$T\pi_t(x) = T(te^{-xt}) = -\log t \, t^{x-1/2}.$$

From the power series expansions of $\log(1-t) = -\sum_{k=1}^\infty t^k/k$ and

$$(1-t)^{x-1/2} = \sum_{k=0}^\infty \frac{(\frac{1}{2}-x)(\frac{3}{2}-x)\dots(\frac{2k-1}{2}-x)}{k!} t^k,$$

where both power series have a radius of convergence of 1, it follows that $T\pi_t(x) = \sum_{k=0}^\infty \gamma_k^{(x)}(1-t)^k$ for all $x > 0$ and $t \in [a', b']$ with

$$\gamma_k^{(x)} = -\sum_{n=1}^k \frac{(\frac{1}{2}-x)(\frac{3}{2}-x)\dots(\frac{2k-1}{2}-x)}{(n-k)k!}.$$

Let us define polynomials of degree $m-1$ by

$$p_{m-1}^{(x)}(t) = \sum_{k=0}^{m-1} \gamma_k^{(x)}(1-t)^k.$$

Note that if $x \in [0, 1]$, then, for all $k \geq 1$, we have $|\gamma_k^{(x)}| \leq k$. Hence

$$\begin{aligned} \int_0^1 \|T\pi \cdot(x) - p_{m-1}^{(x)}\|_{H'} dx &= \int_0^1 \left\| \sum_{k=0}^\infty \gamma_{k+m}^{(x)}(1-t)^{k+m} \right\|_{H'} dx \\ &\leq C_1(1-a')^m \int_0^1 \sum_{k=0}^\infty (k+m)(1-a')^k dx \\ &\leq C_2(1-a')^m, \end{aligned}$$

for some constants $C_1, C_2 > 0$ and where the last sum converges since $0 < 1 - a' < 1$.

Now let us consider the case $1 \leq x < m$. Denote by $[x]$ the greatest integer lower or equal than x . Note that $t \mapsto t^{[x]} p_{m-1-[x]}^{(x-[x])}(t)$ is a polynomial of degree $m-1$ and that $x - [x] \in [0, 1]$. By using the preceding result we obtain

$$\begin{aligned} \int_1^m \left\| T\pi_t(x) - t^{[x]} p_{m-1-[x]}^{(x-[x])} \right\|_{H'} dx &= \int_1^m \left\| -\log t t^{x-1/2} - t^{[x]} p_{m-1-[x]}^{(x-[x])} \right\|_{H'} dx \\ &\leq \int_1^m b'^{[x]} \left\| -\log t t^{x-[x]-1/2} - \sum_{k=0}^{m-1-[x]} \gamma_k^{(x)} (1-t)^k \right\|_{H'} dx \\ &\leq C_2 \sum_{p=1}^m b'^p (1-a')^{m-1-p} \\ &\leq C_2 m \eta^m, \end{aligned}$$

with $\eta = \max\{1 - a', b'\}$. Finally we consider the case $x \geq m$. Note that

$$|T\pi_t(x)| = \left| \log t t^{x-1/2} \right| \leq C_3 \eta^x.$$

Hence, since $\eta < 1$,

$$\int_m^\infty \|T\pi_t(x)\|_{H'} dx \leq C_4 \int_m^\infty \eta^x dx \leq C_5 \eta^m.$$

Combining all arguments, it follows that

$$\int_0^\infty |\pi_{f_*}(x)| dx \leq \|f_*\|_H (C_2 + mC_2 + C_5) \eta^m \leq C_6 m \eta^m. \quad (4.17)$$

Now we consider a sequence $(f_{*,n})_n$ that satisfies, for all $n \geq 1$, $f_{*,n} \in V_{m_n+2} \cap V_{m_n}^\perp$, $\|f_{*,n}\|_H \leq 1$ and $f_0 \pm f_{*,n} \in \mathbb{H}_1$ for all n . Taking $m_n = D \log n$ with $D \log \eta < -1$ we get $m_n \eta_n^m = D \log n n^{D \log \eta} = o(n^{-1})$. Hence $(1 + C_6 m_n \eta_n^m)^n \rightarrow 1$, as $n \rightarrow \infty$. Furthermore, by (4.17) and by applying Hospital's rule,

$$\begin{aligned} &\lim_{n \rightarrow \infty} (m_n + 1)^{2\alpha} \left\{ \left(1 + \int_0^\infty |\pi_{f_*}(x)| dx \right)^n - 1 \right\} \\ &\leq \lim_{n \rightarrow \infty} (m_n + 1)^{2\alpha} \left\{ (1 + C_6 m_n \eta_n^m)^n - 1 \right\} \\ &= \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{(1 + C_6 D \log n n^{D \log \eta})^n - 1}{(D \log n + 1)^{-2\alpha}} \\ &= \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{(1 + C_6 D \log n n^{D \log \eta})^n C_6 D n^{D \log \eta - 1} [1 + D \log \eta \log n]}{-2\alpha (D \log n + 1)^{2\alpha - 1} n^{-1}} \\ &= -\frac{C_6}{2\alpha} \lim_{n \rightarrow \infty} (1 + C_6 D \log n n^{D \log \eta})^n \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{n^{D \log \eta} [1 + D \log \eta \log n]}{(D \log n + 1)^{2\alpha - 1}} \\ &= 0, \end{aligned}$$

where the last equality is true because of $D \log \eta < -1$. Hence, (4.16) holds.

Now by Theorem 4.5 and the above results, we obtain for any $c \in (0, 1)$

$$\begin{aligned} & \inf_{\hat{f} \in \mathcal{S}_n} \sup_{f \in \{f_0 + \mathcal{C}\} \cap \mathbb{H}_1} \mathbb{E}_f \|f - \hat{f}\|_H^2 \\ & \geq c \|f_{*,n}\|_H^2 - \frac{c}{(1-c)^2} \left(\left(1 + \int |\pi_{f_{*,n}}(x)| dx \right)^n - 1 \right) \\ & \geq \frac{cC_1^2}{(m_n + 1)^{2\alpha}} (1 + o(1)), \end{aligned}$$

where the constant C_1 is as in Remark 4.9, namely, $C_1 = C$ if $\alpha > 1$.

Finally, define $f_0(t) = M\varphi_1(t) = Me^{-t/2}$ with M such that $f_0 \in \mathbb{H}_1$. Then $f_0(t) \geq f_0(b) > 0$ for all $t \in [a, b]$. Thus, the above results hold for this specific f_0 . Furthermore, $f_0 \in V_1 \subset V_m$ for all $m \geq 1$ and hence $f_0 + \mathcal{C}_{f_0}(K, \mathbf{u}, C) \subset \mathcal{C}(\mathbf{u}, C)$. This implies (4.13).

APPENDIX A

PROOF OF THE INFORMATION BOUND

For the proof of the information inequality (1.14) of Theorem 1.4, we first give some preliminary results.

As mentioned in Section 1.4, the Hellinger derivative $\dot{\xi}_\theta$ takes over the role of the score function $\dot{\ell}_\theta = \partial_\theta \log f_\theta$. A regular model typically satisfies $\mathbb{E}_\theta[\dot{\ell}_\theta(X)] = \int \partial_\theta f_\theta d\nu = 0$. As $f_\theta = \xi_\theta^2$, this is equivalent to $\int \xi_\theta \partial_\theta \xi_\theta d\nu = 0$. The following lemma shows that the Hellinger derivative satisfies a similar relation, namely $\int \dot{\xi}_\theta \xi_\theta d\nu = 0$.

Lemma A.1. *Let \mathcal{P} be Hellinger differentiable at an interior point θ_0 of Θ with derivative $\dot{\xi}_{\theta_0}$. Then $\nu(\xi_{\theta_0} \dot{\xi}_{\theta_0}) = 0$.*

Proof. Without loss of generality take $\theta_0 = 0$. Define

$$r_\theta(x) = \xi_\theta(x) - \xi_0(x) - \theta^T \dot{\xi}_0(x). \quad (\text{A.1})$$

By Hellinger differentiability at 0, $\|r_\theta\| = o(|\theta|)$, as $\theta \rightarrow 0$. Recall that, for all θ , the norm of ξ_θ is one. This implies that

$$\begin{aligned} 0 &= \|\xi_\theta\|^2 - \|\xi_0\|^2 \\ &= \|\theta^T \dot{\xi}_0\|^2 + \|r_\theta\|^2 + 2\langle \xi_0, \theta^T \dot{\xi}_0 \rangle + 2\langle \xi_0, r_\theta \rangle + 2\langle \theta^T \dot{\xi}_0, r_\theta \rangle \\ &= o(|\theta|) + O(|\theta|), \end{aligned}$$

as $\theta \rightarrow 0$. The dominating term is $2\langle \xi_0, \theta^T \dot{\xi}_0 \rangle$. Because of the exact 0 on the left side, the convergence of $2\langle \xi_0, \theta^T \dot{\xi}_0 \rangle$ must be smaller than $O(|\theta|)$. As 0 is an interior point of Θ , for any sequence $\theta_n \rightarrow 0$, it is necessary that

$$\theta_n^T \langle \xi_0, \dot{\xi}_0 \rangle = o(|\theta_n|).$$

Therefore, $\langle \xi_0, \dot{\xi}_0 \rangle = 0$. This completes the proof. \square

Lemma A.2. *Let \mathcal{P} be Hellinger differentiable at an interior point θ_0 with derivative $\dot{\xi}_{\theta_0}$. Let T be an estimator that is square integrable in a neighborhood U of θ_0 , that is $\sup_{\theta \in U} \|T\xi_\theta\| < \infty$. Then $\gamma_\theta \equiv P_\theta T = \nu(T\xi_\theta^2)$ is differentiable at θ_0 with derivative $\dot{\gamma}_{\theta_0}$ given by*

$$\dot{\gamma}_{\theta_0} = 2\nu\left(\xi_{\theta_0} \dot{\xi}_{\theta_0} T\right).$$

Proof. Without loss of generality take $\theta_0 = 0$. To start with we suppose that T is bounded by some finite constant K . With r_θ defined as in (A.1) we get

$$\begin{aligned} |\gamma_\theta - \gamma_0 - 2\theta^T \nu(\xi_0 \dot{\xi}_0 T)| &= |\nu(\xi_\theta^2 - \xi_0^2 - 2\theta^T \xi_0 \dot{\xi}_0 T)| \\ &= \nu |(\theta^T \dot{\xi}_0)^2 + r_\theta^2 + 2\xi_0 r_\theta + 2\theta^T \dot{\xi}_0 r_\theta| |T| \\ &\leq K \left(|\theta|^2 \|\dot{\xi}_0\|^2 + \|r_\theta\|^2 + 2\|\xi_0\| \|r_\theta\| + 2|\theta| \|\dot{\xi}_0\| \|r_\theta\| \right) \\ &= o(|\theta|), \end{aligned}$$

as $\theta \rightarrow 0$. To treat the unbounded case, let $K = K_\theta$ depend on θ such that

$$K_\theta \rightarrow \infty \quad \text{and} \quad \max\{|\theta|, |\theta|^{-1} \|r_\theta\|\} K_\theta \rightarrow 0, \quad \theta \rightarrow 0.$$

Then on the one hand on the set $\{|T| \leq K_\theta\}$ we have

$$\begin{aligned} |\gamma_\theta - \gamma_0 - 2\theta^T \nu(\xi_0 \dot{\xi}_0 T)| \mathbb{1}\{|T| \leq K_\theta\} &\leq K_\theta \left(|\theta|^2 \|\dot{\xi}_0\|^2 + \|r_\theta\|^2 + 2\|\xi_0\| \|r_\theta\| + 2|\theta| \|\dot{\xi}_0\| \|r_\theta\| \right) \\ &= o(|\theta|). \end{aligned}$$

On the other hand, concerning the set $\{|T| > K_\theta\}$, we have

$$\begin{aligned} &\left| \left\{ \gamma_\theta - \gamma_0 - 2\theta^T \nu(\xi_0 \dot{\xi}_0 T) \right\} \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} \right| \\ &\leq |\nu(\xi_\theta^2 - \xi_0^2) T| \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} + 2|\theta| \nu \left(|\xi_0 \dot{\xi}_0 T| \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} \right) \\ &\leq \nu \left(\left| \theta \dot{\xi}_0 \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} + r_\theta \right| |\xi_\theta T + \xi_0 T| \right) + 2|\theta| \left\| \dot{\xi}_0 \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} \right\| \|\xi_0 T\| \\ &\leq \left(|\theta| \left\| \dot{\xi}_0 \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} \right\| + \|r_\theta\| \right) (\|\xi_\theta T\| + \|\xi_0 T\|) + 2|\theta| \left\| \dot{\xi}_0 \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} \right\| \|\xi_0 T\|, \end{aligned}$$

where the second inequality is obtained by using $\xi_\theta^2 - \xi_0^2 = (\theta \dot{\xi}_0 + r_\theta)(\xi_\theta + \xi_0)$ and by the Cauchy-Schwarz inequality. The dominated convergence theorem yields that

$$\left\| \dot{\xi}_0 \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} \right\| = o(1).$$

Together with $C = \sup_{\theta \in U} \|T \xi_\theta\| < \infty$, it follows that

$$\left| \left\{ \gamma_\theta - \gamma_0 - 2\theta^T \nu(\xi_0 \dot{\xi}_0 T) \right\} \mathbb{1}\{|T| > K_\theta\} \right| \leq (|\theta| o(1) + \|r_\theta\|) 2C + 2|\theta| o(1) C = o(|\theta|).$$

This concludes the proof. \square

Finally, we prove the information inequality (1.14).

Proof of Theorem 1.4

Without loss of generality take $\theta_0 = 0$. By Lemma A.2 the function $\gamma_\theta \equiv P_\theta T = \nu(T \xi_\theta^2)$ is differentiable at 0 with derivative $\dot{\gamma}_0 = 2\nu(\xi_0 \dot{\xi}_0 T)$. For any vector $\alpha \in \mathbb{R}^d$ we obtain by Lemma A.1 and by the Cauchy-Schwarz inequality that

$$\begin{aligned} (\alpha^T \dot{\gamma}_0)^2 &= 4 \left(\nu \left(\alpha^T \dot{\xi}_0 (T - \gamma_0) \xi_0 \right) \right)^2 \\ &\leq 4 \alpha^T \nu(\dot{\xi}_0 \dot{\xi}_0^T) \alpha \nu(\xi_0^2 (T - \gamma_0)^2) \\ &= \alpha^T I_{\theta_0} \alpha \mathbb{P}_{\theta_0}(T - \gamma_0)^2. \end{aligned}$$

Choose $\alpha = I_{\theta_0}^{-1} \dot{\gamma}_0$ to complete the proof.

APPENDIX B

CENTRAL LIMIT THEOREM FOR L -STATISTICS

B.1 INTRODUCTION

Let (X_1, \dots, X_n) be an i.i.d. sample from some distribution F . Let h be a real-valued function and $c_{i,n}$ real numbers. Then an L -statistic is defined as a linear combination of (transformed) order statistics by

$$L_n = \sum_{i=1}^n c_{i,n} h(X_{(i,n)}),$$

where $X_{(i,n)}$ denotes the i -th order statistic associated with the sample (X_1, \dots, X_n) .

In the literature various central limit theorems exist. According to the method of proof one can distinguish two different approaches. The first approach consists in approximating the L -statistic by a sum of i.i.d. random variables such that the asymptotic normality of the L -statistic results from the classical central limit theorem. This can be achieved by using Hájek projection (van der Vaart, 1998, p. 318), defining pseudo-random variables (Shorack, 2000) or using the influence function (Serfling, 1984). Although it is elegant to transform the problem such that standard results can be applied, the necessary assumptions are not the most general ones. All the above mentioned central limit theorems require that h is a monotone function or even the identity. On the one hand monotony of h does not seem to be restrictive as any function of bounded variation can be written as the sum of two monotone functions. But on the other hand, the practical computation of an explicit expression of the limit variance in the case where h is not monotone can be very involved. This goal is even more difficult to achieve in multidimensional setting.

Another approach is based on the representation of the L -statistic as a functional T evaluated at the empirical distribution function \hat{F}_n and the application of the functional delta method. More precisely, let

$$T(F) = \int_0^1 J(t) h \circ F^{-1}(t) dt \tag{B.1}$$

for some function J and where $F^{-1}(t) = \inf\{x : F(x) \geq t\}$ denotes the quantile function of the distribution function F . Let the weights $c_{i,n}$ be given by $c_{i,n} = \int_{(i-1)/n}^{i/n} J(t) dt$. Then the

L -statistic can be written as $L_n = T(\hat{F}_n)$. The functional delta method yields that the difference $\sqrt{n}(T(\hat{F}_n) - T(F))$ converges weakly with limit distribution depending on the Hadamard derivative of T . An explicit expression of the limit variance is available also in the case when h is not monotone. Moreover, a multidimensional version of the central limit theorem is straightforward. Central limit theorems for L -statistics of the form of (B.1) are presented in van der Vaart (1998), p.322, under the assumption that the function J vanishes at the borders of the interval $[0, 1]$.

The L -statistics appearing in Condition (v) of Theorem 3.6 are not covered by the above mentioned central limit theorems. Notably, h is not necessarily monotone and the L -statistic cannot be written in the form of (B.1). Furthermore, the weights do not vanish at the borders. In fact, the largest weights are associated with the largest observations.

The purpose of the following section is to develop a central limit theorem that applies to L -statistics as they appear in Theorem 3.6. Namely, we will not require that h is monotone and we will consider weights that are defined by $c_{i,n} = w(i/n)/n$ for some function w that does not vanish at the borders of $[0, 1]$. Since a closed-form expression of the limit variance is required as well as a multidimensional version of the central limit theorem, we will use the functional delta method to derive an appropriate central limit theorem.

B.2 GENERAL CENTRAL LIMIT THEOREM FOR L -STATISTICS

In the following we consider L -statistics of the form

$$L_n(h) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w(i/n)h(X_{(i,n)}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w \circ \hat{F}_n(X_i)h(X_i),$$

for functions $h : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ and $w : [0, 1] \rightarrow \mathbb{R}$ and where \hat{F}_n denotes the empirical distribution function associated with the sample (X_1, \dots, X_n) with distribution F . Denote by \mathcal{S} the set of all right-continuous functions $f : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ with finite left limit at all points. Let $DF \subset \mathcal{S}$ be the set of all distribution functions defined on \mathbb{R} . Define the functional φ on DF by

$$\varphi(G) = \int h(x)w \circ G(x)dG(x). \quad (\text{B.2})$$

Further, define the empirical process

$$\nu_n(h) = \sqrt{n}(L_n(h) - \mathbb{E}[w \circ F(X)h(X)]) = \sqrt{n}(\varphi(\hat{F}_n) - \varphi(F)).$$

We will derive the asymptotic normality of $\nu_n(h)$ by the functional delta method. The delta method states that under differentiability conditions of some functional φ the weak convergence of a sequence of statistics $r_n(T_n - \theta_0) \xrightarrow{d} T$ to some random element T implies the convergence of $r_n(\varphi(T_n) - \varphi(\theta_0)) \xrightarrow{d} \varphi'_{\theta_0}(T)$, where φ'_{θ_0} is a ‘derivative’ of φ . The functional delta method is based on Hadamard differentiability, where the derivative is a linear approximation of φ with a negligible remainder term. To be more precise, let us define the Hadamard differentiability.

Definition B.1. Let \mathbb{D} and \mathbb{E} be normed linear spaces. A map $\varphi : D \subset \mathbb{D} \rightarrow \mathbb{E}$ is called *Hadamard differentiable* at $\theta_0 \in D$ if there exists a continuous, linear map $\varphi'_{\theta_0} : \mathbb{D} \rightarrow \mathbb{E}$, such that for all

sequences $h_t \rightarrow h$ with $\theta_0 + th_t \in D$ for all small $t > 0$,

$$\left\| \frac{\varphi(\theta_0 + th_t) - \varphi(\theta_0)}{t} - \varphi'_{\theta_0}(h) \right\|_{\mathbb{E}} \rightarrow 0, \quad \text{as } t \downarrow 0. \quad (\text{B.3})$$

If φ'_{θ_0} exists only on a subset D_0 of \mathbb{D} and the sequences $h_t \rightarrow h$ are restricted to converge to limits h in D_0 , then φ is called Hadamard differentiable at θ_0 tangentially to D_0 . The function φ'_{θ_0} is called the *Hadamard derivative* of φ at θ_0 .

The functional delta method can then be stated as follows, (see e.g. van der Vaart (1998), p. 297).

Theorem B.2 (Functional delta method). *Let \mathbb{D} and \mathbb{E} be normed linear spaces. Let $\varphi : D \subset \mathbb{D} \rightarrow \mathbb{E}$ be Hadamard differentiable at θ_0 tangentially to $D_0 \subset \mathbb{D}$. Assume that (T_n) is a sequence of random elements with values in D . Let (r_n) be a sequence of numbers with $r_n \rightarrow \infty$. If*

$$r_n(T_n - \theta_0) \xrightarrow{d} T,$$

for some random element T taking its values in D_0 , then

$$r_n(\varphi(T_n) - \varphi(\theta_0)) \xrightarrow{d} \varphi'_{\theta_0}(T).$$

To derive the limit distribution of $\nu_n(h)$ by the functional delta method, we first have to verify that the function φ defined by (B.2) is Hadamard differentiable. This is the assertion of the following lemma provided that h has compact support and w is differentiable.

Lemma B.3. *Suppose that the following conditions hold*

- (i) $h : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ is continuous, of bounded variation with compact support $[a, b]$;
- (ii) $w : [0, 1] \rightarrow \mathbb{R}_+$ is differentiable and $\sup_{u \in [0, 1]} |w'(u)| < \infty$;
- (iii) F is a distribution function that is continuous and strictly increasing on $[a, b]$.

Then $\varphi : DF \rightarrow \mathbb{R}$ defined in (B.2) is Hadamard differentiable at F tangentially to $D_0 \equiv \{H \in \mathcal{S} : H \text{ is continuous}\}$ with Hadamard derivative φ'_F given by

$$\varphi'_F(G) = - \int G(x) w \circ F(x) dh(x). \quad (\text{B.4})$$

Proof. Let $G \in D_0$ and $G_t \in \mathcal{S}$ be such that $G_t \rightarrow G$ uniformly as $t \downarrow 0$ and $F_t = F + tG_t \in DF$ for all $t \geq 0$ small enough. We have to show that

$$\left| \frac{\varphi(F_t) - \varphi(F)}{t} - \varphi'_F(G) \right| \rightarrow 0, \quad t \downarrow 0,$$

where φ'_F is defined by (B.4). We have

$$\frac{\varphi(F_t) - \varphi(F)}{t} = \int h \times \frac{w \circ F_t - w \circ F}{t} dF + \int h \times w \circ F_t dG_t.$$

Note that the second integral is well-defined as $G_t = (F_t - F)/t$ is of bounded variation as the difference of two distribution functions. The integrand of the first integral is bounded as

$$\begin{aligned} \left| h \times \frac{w \circ F_t - w \circ F}{t} \right| &\leq \|h\| \|w'\|_\infty \frac{|F_t - F|}{t} = \|h\| \|w'\|_\infty |G_t| \\ &\leq \|h\|_\infty \|w'\|_\infty (\sup_{x \in [a,b]} |G(x)| + \delta) < K, \end{aligned}$$

for some constant $K > 0$ and some $\delta > 0$ and all t small enough, where we used that h has compact support and G is continuous. Thus, by the dominated convergence theorem, we obtain

$$\int h \times \frac{w \circ F_t - w \circ F}{t} dF \rightarrow \int h \times w' \circ F \times G dF = \int h \times G dw \circ F,$$

where the equality comes from the continuity of F . Now, by integration by parts and the compact support of h , it follows for the second integral that

$$\begin{aligned} \int h \times w \circ F_t dG_t &= - \int G_t d[h \times w \circ F_t] \\ &= - \int G_t \times h dw \circ F_t - \int G_t \times w \circ F_t dh. \end{aligned}$$

Since, on the support $[a, b]$ of h , $|G_t \times w \circ F_t| \leq (\sup_{x \in [a,b]} |G(x)| + \delta) \|w\|_\infty \leq K'$, we obtain by dominated convergence and by the continuity of w that

$$\int G_t \times w \circ F_t dh \rightarrow \int G \times w \circ F dh.$$

Furthermore, since F_t is a distribution function for all t ,

$$\int G_t \times h dw \circ F_t = \int G_t \circ F_t^{-1} \times h \circ F_t^{-1} dw.$$

Again the integrand is bounded by some constant. Furthermore, under the conditions of the lemma, $F_t^{-1}(u) \rightarrow F^{-1}(u)$ for all $u \in [0, 1]$ and $G_t(x_t) \rightarrow G(x)$ for all $x_t \rightarrow x$ as $t \rightarrow 0$. Hence,

$$\int G_t \circ F_t^{-1} \times h \circ F_t^{-1} dw \rightarrow \int G \circ F^{-1} \times h \circ F^{-1} dw = \int G \times h dw \circ F.$$

Combining all arguments, gives

$$\frac{\varphi(F_t) - \varphi(F)}{t} \rightarrow - \int G \times w \circ F dh.$$

This concludes the proof. □

Theorem B.4. *Suppose that*

- (i) h is continuous and of bounded variation on bounded intervals;
- (ii) w is differentiable and $\sup_{u \in [0,1]} |w'(u)| < \infty$;
- (iii) F is a distribution function that is continuous and strictly increasing on $[a, b]$;
- (iv) $\mathbb{E}[|h(X)|] < \infty$ and $\mathbb{E}[(w \circ F(X)h(X))^2] < \infty$ and $\sigma^2(h) < \infty$ where $\sigma^2(\cdot)$ is defined by (B.5).

Then $\nu_n(h) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \sigma^2(h))$ with limit variance given by

$$\sigma^2(h) = \int_{\mathbb{R}^2} w \circ F(x) w \circ F(y) (F(x \wedge y) - F(x)F(y)) dh(x)dh(y). \quad (\text{B.5})$$

Remark B.5. Note that Condition (iv) holds if $\mathbb{E}[h^2(X)] < \infty$.

Proof. To start with, suppose that, in addition to (i), h has compact support. Then by Lemma B.3, φ is Hadamard differentiable at F . We know that $\sqrt{n}(\hat{F}_n - F)$ converges weakly to an F -Brownian bridge, denoted by B , with covariance function $\text{Cov}(B(x), B(y)) = F(x \wedge y) - F(x)F(y)$. By continuity of B , the Hadamard derivative of φ'_F is given by (B.4). Hence, from the functional delta method it follows that

$$\sqrt{n}(\varphi(\hat{F}_n) - \varphi(F)) \xrightarrow{d} - \int B(x) w \circ F(x) dh(x).$$

By linearity of the integral, the random variable on the right-hand side is normally distributed with zero mean and variance given by

$$\begin{aligned} \sigma^2(h) &= \mathbb{E} \left[\left(\int w \circ F(x) B(x) dh(x) \right)^2 \right] \\ &= \int \int w \circ F(x) w \circ F(y) (F(x \wedge y) - F(x)F(y)) dh(x)dh(y). \end{aligned}$$

Thus, the theorem holds for h with compact support.

Now let h be a function with arbitrary support satisfying assumption (i). The assertion follows from an approximation of h by a sequence of functions with compact support. More precisely, for a given compact interval A and its complement A^c define the functions $\zeta_A = h \mathbb{1}_A$ and $\zeta_{A^c} = h - \zeta_A$. Note that

$$\nu_n(h) = \nu_n(\zeta_A) + \nu_n(\zeta_{A^c}).$$

The first term on the right-hand side is asymptotically normal since ζ_A has compact support and is of bounded variation. In addition, by a convenient choice of A the second term can be made arbitrarily small. This yields the asymptotic normality of $\nu_n(h)$. More formally, we have

$$\begin{aligned} \nu_n(\zeta_{A^c}) &= \sqrt{n} \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left\{ w \circ \hat{F}_n(X_i) - w \circ F(X_i) \right\} \zeta_{A^c}(X_i) \right) \\ &\quad + \sqrt{n} \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w \circ F(X_i) \zeta_{A^c}(X_i) - \mathbb{E} [w \circ F(X) \zeta_{A^c}(X)] \right). \end{aligned}$$

By (iv) the second term on the right side converges weakly to a normal distribution with zero mean and variance $\text{Var}(w \circ F(X) \zeta_{A^c}(X))$. Furthermore,

$$\begin{aligned} &\sqrt{n} \left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left\{ w \circ \hat{F}_n(X_i) - w \circ F(X_i) \right\} \zeta_{A^c}(X_i) \right| \\ &\leq L \sup_{z \in \mathbb{R}} \left\{ \sqrt{n} \left| \hat{F}_n(z) - F(z) \right| \right\} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\zeta_{A^c}(X_i)| \\ &= O_p(1) \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\zeta_{A^c}(X_i)|. \end{aligned}$$

Since $\mathbb{E}[|h(X)|] < \infty$ and $\mathbb{E}[(w \circ F(X)h(X))^2] < \infty$ by (iv), the set A can be chosen such that $\mathbb{E}|\zeta_{A^c}(X)|$ and $\text{Var}(w \circ F(X)\zeta_{A^c}(X))$ are arbitrarily small. Hence, for every $\varepsilon > 0, \eta > 0$ there exists a compact interval A such that ζ_{A^c} satisfies

$$\limsup_{n \rightarrow \infty} \mathbb{P}(|\nu_n(\zeta_{A^c})| > \eta) < \varepsilon.$$

Now let $(A_m)_m$ be a sequence of compact sets such that $\zeta_m \equiv h\mathbb{1}_{A_m}$ tends to h . By the dominated convergence theorem and (iv) we obtain that $\lim_{m \rightarrow \infty} \sigma^2(\zeta_m) = \sigma^2(h)$. Then Billingsley (1999), Theorem 3.2, p.28, implies the weak convergence of $\nu_n(h)$ to a centered normal distribution with variance $\sigma^2(h)$ given by (B.5). \square

Centering Constant

By the following lemma one can use $\mathbb{E}[L_n(h)]$ as the centering constant instead of $\mathbb{E}[w \circ F(X)h(X)]$.

Lemma B.6. *Let w be continuously differentiable on $[0, 1]$. Suppose that $\mathbb{E}[|h(X)|] < \infty$. Then*

$$\mathbb{E}[L_n(h)] - \mathbb{E}[w \circ F(X)h(X)] = o(n^{-1/2}).$$

Proof. Using $w(t) - w(s) = \int_s^t w'(u)du$, we obtain

$$\begin{aligned} \mathbb{E}[L_n(h)] - \mathbb{E}[w \circ F(X)h(X)] &= \mathbb{E}\left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(w \circ \hat{F}_n(X_i) - w \circ F(X_i)\right) h(X_i)\right] \\ &= \mathbb{E}\left[\left(w \circ \hat{F}_n(X_1) - w \circ F(X_1)\right) h(X_1)\right] \\ &= \mathbb{E}\left[\int_{F(X_1)}^{\hat{F}_n(X_1)} w'(u)du h(X_1)\right] \\ &\leq \mathbb{E}\left[\sup_{u \in [F(X_1), \hat{F}_n(X_1)]} |w'(u)| |\hat{F}_n(X_1) - F(X_1)| |h(X_1)|\right] \\ &\leq \mathbb{E}\left[\sup_{u \in [F(X_1), \hat{F}_n(X_1)]} w'(u)^2 |h(X_1)|\right]^{1/2} \mathbb{E}\left[(\hat{F}_n(X_1) - F(X_1))^2 |h(X_1)|\right]^{1/2}, \end{aligned}$$

where the last inequality is obtained by Cauchy-Schwarz. Further,

$$\begin{aligned} &\mathbb{E}\left[(\hat{F}_n(X_1) - F(X_1))^2 |h(X_1)|\right] \\ &= \mathbb{E}\left[\left\{\frac{1}{n^2} \sum_{i,j=1}^n \mathbb{1}\{X_i \leq X_1, X_j \leq X_1\} - \frac{2}{n} \sum_{i=1}^n \mathbb{1}\{X_i \leq X_1\} F(X_1) + F^2(X_1)\right\} |h(X_1)|\right] \\ &= \left(\frac{2-n}{n^2} \mathbb{E}[F^2(X)|h(X)] + \frac{n-3}{n^2} \mathbb{E}[F(X)|h(X)] + \frac{1}{n^2} \mathbb{E}[|h(X)|]\right) \\ &= O(n^{-1}). \end{aligned}$$

And because w' is bounded and continuous, the dominated convergence theorem applies and gives

$$\mathbb{E}\left[\sup_{u \in [F(X_1), \hat{F}_n(X_1)]} w'(u)^2 |h(X_1)|\right] \rightarrow 0,$$

as $n \rightarrow \infty$. This completes the proof. \square

Lemma B.6 implies that a central limit theorem holds with centering constant $\mathbb{E}[L_n(h)]$ instead of $\mathbb{E}[w \circ F(X)h(X)]$.

Corollary B.7. *If the conditions of Theorem B.4 hold and if, in addition, w is continuously differentiable on $[0, 1]$, then*

$$\sqrt{n} (L_n(h) - \mathbb{E}[L_n(h)]) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \sigma^2(h)) ,$$

with $\sigma^2(h)$ given by (B.5).

Estimator of the Limit Variance

Estimators of the limit variance are useful for the construction of asymptotic confidence intervals. The expression of the limit variance in the following proposition suggests a natural estimator of the limit variance.

Proposition B.8. *Under the conditions of Theorem B.4, the limit variance writes*

$$\sigma^2(h) = \mathbb{E} \left[(w \circ F(X))^2 h^2(X) \right] + 2\mathbb{E} \left[w'_1 \circ F(X_1) w'_2 \circ F(X_2) h(X_1) h(X_2) \mathbb{1}\{X_1 > X_2\} \right] , \quad (\text{B.6})$$

where $w_1(t) = (1-t)w(t)$ and $w_2(t) = tw(t)$ and w'_1 and w'_2 denote the derivatives, respectively.

Proof. Let h have compact support. We obtain from (B.5) by integrating by parts that

$$\begin{aligned} \sigma^2(h) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^y w_2 \circ F(x) dh(x) w_1 \circ F(y) dh(y) \\ &\quad + \int_{-\infty}^{\infty} \int_y^{\infty} w_1 \circ F(x) dh(x) w_2 \circ F(y) dh(y) \\ &= - \int_{-\infty}^{\infty} \int_x^{\infty} w_1 \circ F(y) dh(y) h(x) w'_2 \circ F(x) dF(x) \\ &\quad - \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^x w_2 \circ F(y) dh(y) h(x) w'_1 \circ F(x) dF(x) \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} h^2(x) w_1 \circ F(x) w'_2 \circ F(x) dF(x) \\ &\quad + \int_{-\infty}^{\infty} \int_x^{\infty} h(y) w'_1 \circ F(y) dF(y) h(x) w'_2 \circ F(x) dF(x) \\ &\quad - \int_{-\infty}^{\infty} h^2(x) w_2 \circ F(x) w'_1 \circ F(x) dF(x) \\ &\quad + \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^x h(y) w'_2 \circ F(y) dF(y) h(x) w'_1 \circ F(x) dF(x) \\ &= \mathbb{E} \left[h^2(X) w^2 \circ F(X) \right] + 2\mathbb{E} \left[h(X_1) h(X_2) \mathbb{1}\{X_1 > X_2\} w'_1 \circ F(X_1) w'_2 \circ F(X_2) \right] , \end{aligned}$$

where the last equality comes from $w_1(t)w'_2(t) - w_2(t)w'_1(t) = w^2(t)$.

When the support of h is not compact, let A_m be a sequence of compact sets such that $\zeta_{A_m} \equiv h \mathbb{1}_{A_m} \rightarrow h$. Then the dominated convergence theorem yields the assertion. \square

The expression (B.6) of the limit variance suggests a natural estimator of $\sigma^2(h)$ based on i.i.d. observations X_1, \dots, X_n from the distribution F by replacing F with \hat{F}_n and approximating the means \mathbb{E} by the empirical means. To approximate the second mean, we can use a U -statistic. Then an estimator of the limit variance is given by

$$\hat{\sigma}_n^2(h) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w^2(i/n) h^2(X_{(i,n)}) + \frac{2}{n(n-1)} \sum_{i>j} \dot{w}_1(i/n) \dot{w}_2(j/n) h(X_{(i,n)}) h(X_{(j,n)}) .$$

One can show that this estimator is consistent.

Proposition B.9. *Suppose that in addition to the conditions of Proposition B.8 we have $\mathbb{E}[w \circ F(X) \dot{w} \circ F(X) h^2(X)] < \infty$ and $\mathbb{E}[\dot{w}^2 \circ F(X) h^2(X)] < \infty$, then $\hat{\sigma}_n^2(h) \xrightarrow{P} \sigma^2(h)$ as $n \rightarrow \infty$.*

Multidimensional Central Limit Theorem

A multidimensional central limit theorem is straightforward.

Corollary B.10. *If Theorem B.4 holds for every function h_1, \dots, h_K , then a multi-dimensional CLT holds. Denote $\mathbf{h} = (h_1, \dots, h_K)^T$. Then $\nu_n(\mathbf{h}) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \Sigma)$ where $\Sigma = (\sigma_{k,l}^2)$ and for all $k, l = 1, \dots, K$*

$$\begin{aligned} \sigma_{k,l}^2 &= \int_0^\infty \int_0^\infty w \circ F(x) w \circ F(y) (F(x \wedge y) - F(x)F(y)) d(h_k + h_l)(x) d(h_k + h_l)(y) \\ &= \mathbb{E}[w^2(X) h_k(X) h_l(X)] + 2\mathbb{E}[w'_1 \circ F(X_1) w'_2 \circ F(X_2) h_k(X_1) h_l(X_2) \mathbb{1}\{X_1 > X_2\}] . \end{aligned}$$

B.3 CENTRAL LIMIT THEOREM IN THE PILE-UP MODEL

Let us now consider the pile-up model from Definition 3.1. Let (Z_1, \dots, Z_n) be an i.i.d. sample from the pile-up distribution G given in (3.1). We consider L -statistics of the form

$$L_n = \hat{P}_n^c(k) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w(i/n) k(Z_{(i)}) ,$$

where w is the weight function defined in (3.6), and the empirical process defined by (3.22) as

$$\nu_n^c(k) = \sqrt{n} \left(\hat{P}_n^c(k) - \mathbb{E}[k(Y)] \right) .$$

Corollary B.11. *Suppose that Assumption 3.1 holds. Furthermore, assume that*

- (i) k is continuous and of bounded variation on bounded intervals and continuous;
- (ii) the weight function w given by (3.6) is continuously differentiable on $[0, 1]$;
- (iii) $\mathbb{E}[|k(Z)|] < \infty$ and $\mathbb{E}[(w \circ G(Z) k(Z))^2] < \infty$ and $\sigma(|k|)^2 < \infty$ where $\sigma^2(\cdot)$ is defined by (B.5).

Then $\nu_n^c(k) \xrightarrow{d} \mathcal{N}(0, \sigma^2(k))$ with limit variance given by

$$\sigma^2(k) = \mathbb{E} \left[(w \circ G(Z))^2 k^2(Z) \right] + 2\mathbb{E} \left[w'_1 \circ G(Z_1) w'_2 \circ G(Z_2) k(Z_1) k(Z_2) \mathbb{1}\{Z_1 > Z_2\} \right] \quad (\text{B.7})$$

$$= \mathbb{E}[w \circ G(Y) k^2(Y)] - \{ \mathbb{E}[Y v(Y) k(Y)] + \mathbb{E}[k(Y)] \}^2 \\ + 2\mathbb{E} [v(Y_1) \{Y_1 v(Y_2) - 1\} k(Y_1) k(Y_2) \mathbb{1}\{Y_1 > Y_2\}] . \quad (\text{B.8})$$

where w_1 and w_2 are like in Proposition B.8 and $v(t) = w^2(t) \ddot{M} \circ M^{-1}(1 - t)$.

Remark B.12. If $\mathbb{E}[N^2] < \infty$, then Condition (ii) holds.

Proof. By Assumption 3.1, G is continuous. Hence, Proposition B.8 applies and yields the first expression (B.7) of the limit variance. Furthermore, (B.8) follows from (B.7) essentially by applying (3.5) and by the relations $w'(u) = w(u)v(u)$ and $w_1(t)w'_2(t) - w_2(t)w'_1(t) = w^2(t)$. \square

APPENDIX C

BREVET D'INVENTION

Procédé d'estimation des paramètres de la distribution des temps de réponse de particules d'un système, appliqué notamment aux mesures de fluorescence

C.1 ABRÉGÉ DESCRIPTIF

La présente invention concerne un procédé d'estimation de la distribution des temps de réponse de particules d'un système, dans le but notamment de le caractériser. Elle s'applique par exemple aux mesures de fluorescence résolues en temps.

Le procédé comporte au moins :

- une étape (A) de détermination d'une fonction approchant la log-vraisemblance de la distribution cible f_{θ_0} correspondant à une distribution sans effet d'empilement à partir des mesures de temps de réponse de particules détectées avec effet d'empilement, c'est-à-dire des mesures de la distribution g_{θ_0} ;
- une étape (B) de maximisation de la log-vraisemblance approchée sur l'ensemble des paramètres Θ afin de déterminer l'estimateur comme le vecteur θ qui maximise la log-vraisemblance approchée.

C.2 DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé d'estimation de la distribution des temps de réponse de particules d'un système, dans le but notamment de le caractériser. Elle s'applique par exemple aux mesures de fluorescence résolues en temps.

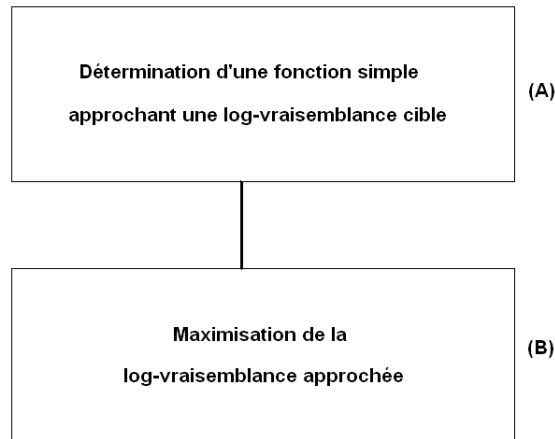


Figure C.1: Les deux étapes du procédé

Problème technique

Des mesures de fluorescence permettent de caractériser notamment des molécules. Plus particulièrement, on éclaire des molécules par des lasers, puis les molécules ainsi excitées libèrent des photons. Les temps entre l'instant d'éclairement par le laser et les instants d'arrivée des photons sur un détecteur permettent de caractériser ces molécules de façon connue. Le nombre de photons émis lors de chaque éclairage est indéterminé, à titre indicatif plus l'impulsion émise par le laser est forte, plus il y a de photons. Il y a par ailleurs un aléa supplémentaire sur les temps de réponse.

Un problème technique général est la mesure de la distribution des temps de réponse d'un système donné dans le but de le caractériser à l'image de l'exemple précédent.

La distribution de ces temps de réponse est généralement paramétrée par un ensemble de paramètres numériques et ce sont ces paramètres que l'on veut mesurer. On notera par la suite cette dépendance envers un jeu de paramètres en appelant f_{θ_0} la densité de probabilité de la distribution des temps de réponse, θ_0 désignant un vecteur de paramètres appartenant à un ensemble Θ de vecteurs θ . A tout élément θ dans Θ on associe une densité de probabilité f_{θ} , et ainsi on définit une famille de distribution $\{f_{\theta}, \theta \in \Theta\}$.

D'un point de vue statistique, cette approche est un problème d'estimation paramétrique. Par exemple, dans le contexte de la fluorescence résolue en temps, où le système étudié est alors un ensemble de molécules fluorescentes, on suppose que la fonction de distribution, paramétrée par un jeu de paramètres, est un mélange d'exponentielles et $\{f_{\theta}, \theta \in \Theta\}$ est l'ensemble des mélanges de densités exponentielles. La modélisation est plus complexe lorsqu'il s'agit de la distribution des temps de réponse d'un système optique ou d'un milieu transparent comme l'atmosphère. Cependant l'extension de cette approche paramétrique à d'autres domaines que la fluorescence résolue en temps est possible.

Les mesures des temps de réponse sont obtenues au moyen d'une excitation pulsée du système à caractériser. On émet une excitation très brève, on mesure le temps mis par le système à répondre à cette excitation et on enregistre ce temps. Ces trois opérations sont répétées un très grand nombre de fois jusqu'à ce qu'on dispose de milliers ou de millions de temps de réponse. Enfin, c'est à partir de cette collection de temps de réponse collectés indépendamment que l'on estime les paramètres

de leur distribution commune.

Le domaine de l'invention concerne les contextes où le système peut émettre un nombre aléatoire de réponses à l'excitation et où seule la première réponse est détectée et enregistrée. Dans le contexte de la fluorescence résolue en temps, l'excitation est une impulsion laser envoyée sur l'échantillon fluorescent et la réponse de cet échantillon est constituée en général de plusieurs photons, car il y a un très grand nombre de molécules fluorescentes présentes. On enregistre seulement le temps de réponse correspondant au premier photon car ce premier photon aveugle l'appareillage électronique de détection et d'enregistrement. Ce phénomène d'oubli des deuxième, troisième photons et des suivants est appelé empilement ou 'pile-up' dans la littérature anglo-saxonne.

L'invention concerne donc les contextes qui comportent notamment les quatre caractéristiques suivantes :

- Mesure de la distribution de temps de réponse d'un système,
- Distribution paramétrée,
- Mise à disposition d'une collection généralement grande de temps de réponse mesurés indépendamment,
- Le système étudié émet un nombre aléatoire de réponses à chaque excitation mais seule la première réponse est vue par l'appareillage de mesure.

Ces quatre conditions sont rencontrées dans la méthode de mesure dite 'Time Correlated Single Photon Counting' (TCSPC) en fluorescence résolue en temps.

Des données du type 'pile-up' sont rencontrées en fluorescence résolue en temps. Il s'agit d'estimer la distribution des durées de vie en fluorescence. La constante de durée de vie d'une molécule est le temps moyen entre l'instant d'excitation de la molécule et l'instant d'émission d'un photon. Elle contient des précieuses informations sur les molécules et leur milieu, par exemple le pH, la polarisation, ou la viscosité. Elle est donc de grand intérêt en biologie, en médecine ou en physique notamment. Typiquement, la distribution de la durée de vie d'une molécule est modélisée par une loi exponentielle. Or, la distribution des temps d'arrivée d'un mélange des molécules correspond à un mélange des lois exponentielles. En outre, le nombre de photons émis par impulsion de laser d'excitation est modélisé par une loi de Poisson.

Les observations disponibles pour l'estimation des paramètres exponentiels peuvent être obtenues par la méthode TCSPC, aussi appelée la méthode SPT (Single Photon Timing), comme le montrent notamment les documents de Valeur (2002) et O'Connor & Phillips (1984). Dans la méthode TCSPC un coup de laser excite un nombre aléatoire de photons, mais pour des raisons techniques seulement le temps de réponse du photon qui arrive le premier au détecteur peut être enregistré. Les autres photons fluorescents ne sont pas observables. En TCSPC le réglage de l'intensité de laser, ou l'atténuation de la chaîne optique, détermine le nombre moyen de photons détectés par excitation.

Un problème technique est notamment le problème inverse. Plus particulièrement, on veut estimer les paramètres d'une densité de probabilité f_{θ_0} , mais on ne dispose pas d'observations directes de la densité f_{θ_0} . Pourtant on observe le minimum d'un nombre aléatoire des variables aléatoires indépendantes de la densité f_{θ_0} . Il est évident que la densité des observations, notée g_{θ_0} , n'est pas la même que la densité de probabilité f_{θ_0} . En effet, g_{θ_0} résulte de f_{θ_0} par une distorsion non linéaire, effet de l'empilement 'pile-up'. On ne peut pas appliquer les mêmes estimateurs

aux données sans ‘pile-up’, issues de la densité f_{θ_0} , qu’aux données avec ‘pile-up’, issues de la densité g_{θ_0} . Le problème d’estimation vient notamment de la forme compliquée de la densité g_{θ_0} . En effet, les estimateurs classiques, comme l’estimateur du maximum de vraisemblance ou les méthodes des moments, ne sont pas faisables.

Etat de l’art

Il existe au moins deux façons d’affronter le problème inverse où une observation représente le minimum d’un nombre aléatoire de variables aléatoires. En TCSPC il est courant de travailler avec une intensité de laser tellement faible qu’il y a au plus un photon émis par excitation avec une très forte probabilité. Donc, le problème d’une perte de photons, c’est-à-dire de ne pas observer tous les photons qui arrivent sur le détecteur, est évité. Dans ce cas, les temps d’arrivée observés peuvent être considérés comme des réalisations indépendantes d’un mélange exponentiel. Des estimateurs de paramètres du mélange exponentiel sont obtenues par des méthodes statistiques classiques comme la méthode des moindres carrées décrite dans le document de Valeur (2002) précité, ou la méthode du maximum d’entropie décrite dans le document de Brochon (1994).

Or, une très basse intensité de laser entraîne un long temps d’acquisition, car sur 100 excitations il n’y a qu’un à trois photons détectés en général. Les autres excitations ne sont pas suivies par la détection d’un photon, donc elles ne contiennent aucune information sur les paramètres à estimer. Il faut alors un grand nombre d’excitations pour obtenir une quantité suffisante de temps d’arrivée pour une estimation fiable des paramètres. Une étude de la borne de Cramér-Rao montre qu’une minuscule intensité de laser entraîne une forte augmentation de la variance des estimateurs et qu’il est préférable de travailler avec un laser plus fort que ceux utilisés habituellement afin d’augmenter l’information sur les paramètres qui est contenue dans les données. Cependant, avec une plus forte intensité, les données subissent l’effet de ‘pile-up’ et il faut des méthodes statistiques adaptées au modèle avec ‘pile-up’.

La littérature sur le modèle statistique de ‘pile-up’, où uniquement le minimum d’un nombre aléatoire de variables aléatoires est observé, est très limitée et, en TCSPC, ces méthodes sont rarement utilisées dans la pratique. Une première méthode, décrite dans le document de Coates (1968) est une correction de l’histogramme pour des données en TCSPC. Il s’agit de repondérer les groupes ou classes de l’histogramme, encore appelés ‘bins’, afin d’obtenir un histogramme de la distribution cible f_{θ_0} . Une généralisation de l’approche de P.B.Coates à une grande classe de distributions est présentée dans le document de Souloumiac (2007). En plus, le document de Souloumiac (2007) étend la méthode de la repondération à la fonction de répartition afin de corriger l’effet de ‘pile-up’. Dans le document de Walker (2002) la méthode de P.B.Coates est adaptée au cas d’un laser non stable. Un inconvénient de ces approches de repondération est qu’elles ne fournissent pas d’estimateurs de paramètres. Après la repondération de l’histogramme ou de la fonction de répartition, il faut appliquer une autre méthode statistique pour arriver à des valeurs estimées des paramètres. La repondération ne représente qu’une première étape dans l’estimation.

Des méthodes d’estimation de paramètres directe pour le modèle ‘pile-up’ ont été développées. Le document de Okano *et al.* (2005) propose une méthode des moindres carrées pour ajuster directement la fonction de densité g_{θ} aux données avec empilement. Les méthodes des moindres carrées sont des ‘large sample methods’ ce qui veut dire que l’on a besoin d’un très grand nombre de temps de réponse afin d’obtenir des estimateurs fiables. Comme nous cherchons à diminuer le temps d’acquisition, ce procédé n’est pas adapté. Une autre méthode directe est présentée dans le

document de Rebařka (2007) où un échantillonneur de Gibbs est développé qui est bien adaptée au modèle de mélange exponentiel et à un nombre Poissonien de photons par excitation. Cette méthode présente cependant plusieurs inconvénients, en particulier elle nécessite un long temps de calcul et la difficulté d'inclure la fonction d'appareil dans le modèle. Elle ne peut donc pas être utilisée en TCSPC où les mesures contiennent généralement du bruit additif.

Enfin les deux méthodes précédentes ne sont pas très souples dans le sens qu'elles sont restreintes au cas multi-exponentiel. Même si la loi exponentielle est la plus utilisée en fluorescence, il y a des applications avec des distributions de Kohlrausch, comme décrit dans le document de Berberan-Santos *et al.* (2005a) ou des distributions de Becquerel comme décrit dans le document de Berberan-Santos *et al.* (2005b).

L'idée de l'invention

Un but de l'invention est notamment de pallier les inconvénients précités en permettant d'obtenir une estimation directe des paramètres de la distribution des temps, adapté à l'effet de 'pile-up', ne nécessitant donc pas l'atténuation de la puissance du laser utilisé. A cet effet, l'invention a pour objet un procédé d'estimation des paramètres θ_0 de la distribution des temps de réponse de particules réémises par un système, en réponse à une série d'émissions de particules vers ledit système, un temps de réponse d'une particule correspondant étant mesuré entre un instant d'émission et l'instant de détection de ladite particule, le procédé comportant au moins :

- une étape de détermination d'une fonction approchant la log-vraisemblance de la distribution cible f_{θ_0} correspondant à une distribution sans effet d'empilement à partir des mesures de temps de réponse de particules détectées avec effet d'empilement, c'est-à-dire des mesures de la distribution g_{θ_0} ;
- une étape de maximisation de la log-vraisemblance approchée sur l'ensemble des paramètres Θ afin de déterminer l'estimateur comme le vecteur θ qui maximise la log-vraisemblance approchée.

La fonction approchée est une estimation de la log-vraisemblance de la fonction de distribution cible f_{θ_0} basée sur des mesures observées distribuées selon la fonction de distribution g_{θ_0} avec effet d'empilement. Supposons que Z_1, \dots, Z_n représentent les n mesures de temps de réponse. La fonction approchée est obtenue en pondérant chaque terme $\log f_{\theta}(Z_i)$ de la log-vraisemblance par un poids qui compense le fait que Z_i suit une loi g_{θ_0} et non f_{θ_0} à cause du phénomène du 'pile-up'. Pour le terme $\log f_{\theta}(Z_i)$ on peut prendre un poids de la forme

$$\frac{1}{m'(m^{-1}(1 - \hat{G}_n(Z_i)))}$$

où m note la fonction génératrice de N ,

$$m(u) = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbb{P}(N = n)u^n, \quad u \in [0, 1].$$

et m' la dérivée de m et \hat{G}_n est un estimateur de la fonction de répartition.

Si l'on choisit l'estimateur empirique de la fonction de répartition pour ce dernier et si l'on réordonne les observations dans un ordre croissant sous la forme $Z_{(1)} < Z_{(2)} < \dots < Z_{(n)}$ alors

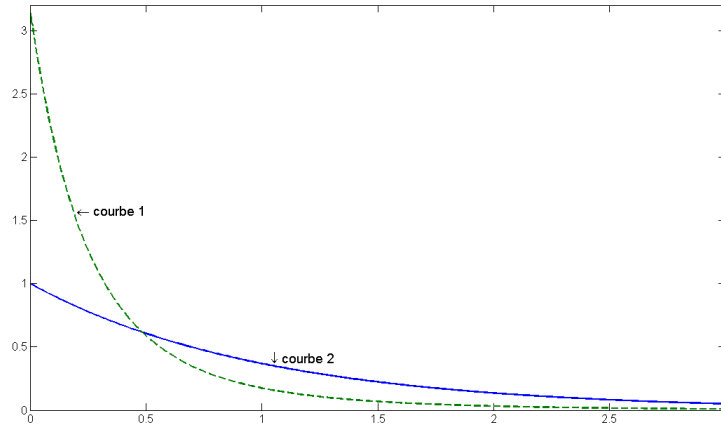


Figure C.2: Effet ‘pile-up’: courbe 1 densité avec ‘pile-up’, courbe 2 densité cible sans ‘pile-up’

le poids $w_{i,n}^*$ correspondant au terme $\log f_{\theta}(Z_{(i)})$ s’écrit

$$w_{i,n}^* = \frac{1}{m'(m^{-1}(1 - i/n))} .$$

La fonction de distribution cible f_{θ_0} est par exemple considérée comme étant un mélange de densités exponentielles.

Avantageusement, dans un mode de mise en œuvre particulier, la fonction de distribution cible prend en compte la fonction d’appareil de mesures, la fonction cible étant le produit de convolution de la fonction cible sans fonction d’appareil (f_{θ_0}) avec la densité de probabilité de la fonction d’appareil η .

Les particules sont par exemple des photons émis par un laser, le système réémettant des photons.

Le système peut être un ensemble de molécules à caractériser par la fonction de distribution cible des temps de réponse.

L’effet ‘pile-up’

D’autres caractéristiques et avantages de l’invention apparaîtront à l’aide de la description qui suit faite en regard de dessins annexés qui représentent :

- la figure C.2, une illustration de l’effet de ‘pile-up’ sur les distributions de mesures de temps de réponse ;
- les figures C.3, C.4 et C.5, des illustrations d’histogrammes de mesures avec effet de ‘pile-up’ pour différentes intensités d’émissions de photons ;
- la figure C.1, une présentation des étapes possibles pour la mise en œuvre d’un procédé selon l’invention.

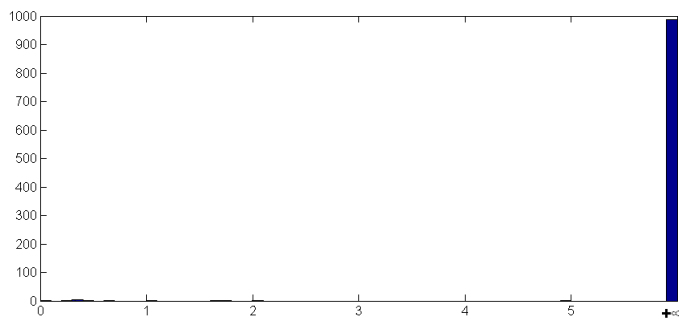


Figure C.3: $\lambda = 0,02$ - 13 observations $< \infty$

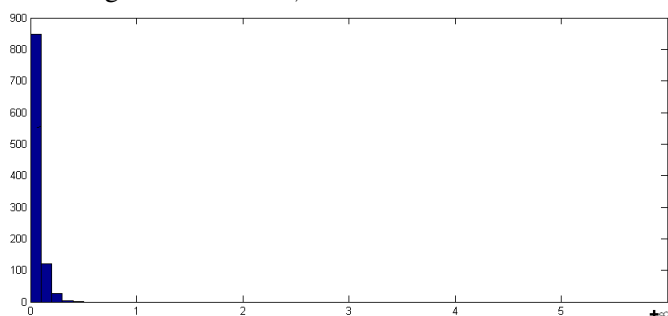


Figure C.4: $\lambda = 20$ - 847 observations dans le premier bin

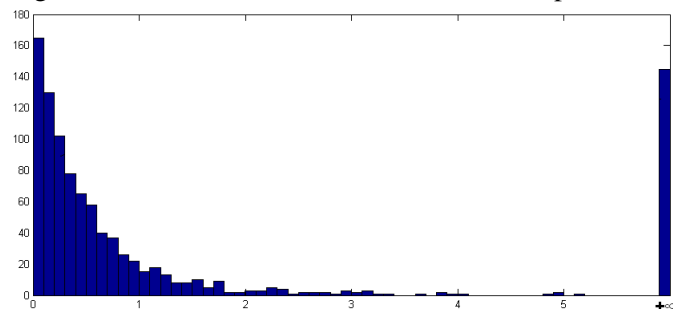


Figure C.5: $\lambda = 2$

La figure C.2 illustre par deux courbes 1, 2 l'effet de 'pile-up' évoqué précédemment dans un système d'axes, où les abscisses représentent les temps de réponse mesurés et l'axe des ordonnées le nombre de photons détectés correspondant à ces temps de réponse. Les valeurs indiquées sont normalisées. La première courbe 1 et la deuxième courbe 2 illustrent respectivement les densités de probabilité g_{θ_0} et f_{θ_0} évoquées précédemment.

Dans la méthode TCSPC on éclaire donc un échantillon de molécules avec un rayon laser par exemple. Les molécules excitées par des photons issus du laser émettent à leur tour des photons qui sont détectés par des moyens appropriés, utilisant notamment des filtres adaptés. On mesure et on enregistre le temps d'arrivée des photons. On obtient ainsi une distribution des temps de réponse caractérisant les molécules. Les temps étant de l'ordre de plusieurs nanosecondes pour une précision exigée de l'ordre d'une picoseconde.

En réalité, il n'y a pas un seul photon. Il y a en fait deux aléas. Le premier aléa porte sur le nombre de photons réémis par les molécules et le deuxième aléa porte sur les temps de réponse, car chaque photon a son temps de réponse associé qui lui est propre et donc indéterminé. Plus le laser émet des impulsions fortes, plus il y a de photons réémis par les molécules. Les temps étant très courts, le chronomètre utilisé ne peut mesurer qu'une seule durée, la durée correspondant au temps du premier photon reçu. Le temps que le chronomètre se réinitialise pour engager une deuxième est alors trop long en regard du phénomène physique observé. La fluorescence est en effet terminée et tous les photons déjà reçus. A chaque impulsion laser, on a donc un certain nombre de photons qui arrivent mais seul le temps de réponse du premier est mesuré. La distribution obtenue n'est donc construite que pour le premier photon reçu, et donc pour le temps de réponse le plus court, conduisant ainsi à une image compressée et finalement à une distorsion de mesure. C'est l'effet d'empilement ou 'pile-up', où seul le premier photon est détecté et mesuré. La fonction de densité associée aux mesures est illustrée par la première courbe 1. Cette courbe 1 présente une forte concentration de mesures correspondant aux temps de réponse très courts.

Une solution connue consiste à baisser la puissance du faisceau laser émis de façon à ce qu'il n'y ait qu'un seul photon réémis à chaque impulsion laser. La distribution obtenue est satisfaisante car dénuée de distorsion. La deuxième courbe 2, de forme exponentielle, illustre la densité associée à cette solution. La différence de la première courbe 1 par rapport à cette deuxième courbe 2 illustre la distorsion provoquée par l'effet de 'pile-up'.

L'avantage des mesures correspondant à la courbe 2 est que l'on sait comment en extraire des paramètres θ_0 recherchés avec des méthodes statistiques, puisqu'il s'agit d'une densité exponentielle ou dans des cas plus complexes d'un mélange exponentiel. Cependant il s'ensuit que dans la grande majorité des cas, pratiquement dans environ 95% impulsions, il n'y a pas de photons réémis. Seules 2% à 5% des impulsions laser émises donnent lieu à la réémission d'un photon. L'obtention d'une distribution selon la deuxième courbe 2 se fait donc avec une perte de temps important. Il existe des applications où la distribution doit être obtenue rapidement et où les pertes de temps de la méthode illustrée par cette deuxième courbe 2 n'est pas admissible. En particulier, dans les cas où le système observé est instable et où plus la mesure est longue, plus il y a de possibilités que l'état du système évolue rendant l'ensemble des mesures inaptés à caractériser le système. Il y a aussi des applications qui nécessitent un haut débit de mesures, notamment dans le domaine médical.

Les figures C.3, C.4 et C.5 illustrent les histogrammes de mesures avec l'effet de 'pile-up' pour des intensités différentes. Comme indiqué précédemment, en TCSPC le réglage de l'intensité de laser, ou l'atténuation de la chaîne optique, détermine le nombre moyen de photons détectés par excitation. L'effet des choix différents de l'intensité sur la distribution des observations est illustré par les trois histogrammes des figures C.3, C.4 et C.5 correspondant à 1000 observations dans chacun des cas. La densité cible f_{θ_0} est une exponentielle de moyenne 1 et chaque histogramme est composé de 1000 observations, c'est-à-dire 1000 impulsions de laser, obtenues par simulation Monte-Carlo. Le dernier bin, noté $+\infty$, représenté sur l'échelle des abscisses, contient le nombre d'observations où aucun photon n'est détecté. L'intensité du laser est exprimée par le nombre moyen λ de photons détectés par excitation. Plus précisément, λ est le paramètre de la loi de Poisson qui est la distribution du nombre de photons détectés par excitation. Quand l'intensité est faible, $\lambda = 0,02$, il n'y a que 13 photons détectés sur 1000 excitations, cas illustré par la figure C.3. Quand l'intensité est très élevée, $\lambda = 20$, la distribution est presque dégénérée car presque toutes les observations se trouvent dans le premier bin, cas illustré par la figure C.4. Dans ces deux cas extrêmes, il est clair que les histogrammes contiennent très peu d'information sur le paramètre exponentiel, de la distribution des temps de réponse, à estimer. Il semble favorable d'utiliser une

intensité moyenne. La figure C.5 montre que $\lambda = 2$ mène à un histogramme ‘habituel’ car les observations où un photon a été détecté sont très nombreuses et les temps d’arrivée sont assez dispersés.

Un but de l’invention est d’obtenir une distribution des temps de réponse conforme à la première courbe 1, sans perte de temps, c’est-à-dire obtenue beaucoup plus rapidement que la distribution selon la deuxième courbe 2. En particulier, la puissance des faisceaux laser émis n’est pas diminuée autant que pour la deuxième courbe 2. C’est notamment la résolution du problème inverse évoqué précédemment, conduisant à l’obtention des paramètres de la distribution selon la deuxième courbe 2. Dans le cas d’une simple exponentielle, par exemple, le paramètre obtenu est le paramètre τ qui caractérise la densité exponentielle $\frac{1}{\tau}e^{-y/\tau}$.

A cet effet, l’invention comporte au moins deux étapes telles qu’illustrées par la figure C.1. Dans une première étape (A) on détermine une fonction simple approchant la log-vraisemblance de la distribution cible, qui est la fonction f_{θ_0} recherchée, illustrée par la deuxième courbe 2 de la figure C.2. La log-vraisemblance, dépendant des mesures de temps de réponse, est une fonction en θ , le vecteur des paramètres qui caractérise la famille des distributions à laquelle appartient la densité cible f_{θ_0} .

Puis dans une deuxième étape (B), on maximise cette log-vraisemblance approchée en θ . Rechercher les paramètres θ_0 de la fonction f_{θ_0} revient en fait à rechercher le vecteur θ des paramètres où la log-vraisemblance atteint son maximum. La maximisation est faite sur tout l’ensemble Θ des paramètres θ qui détermine la famille des distributions à laquelle appartient la densité cible f_{θ_0} .

Ainsi dans la première étape (A), on construit un estimateur de la fonction de log-vraisemblance $\mathbb{E}[\log f_{\theta}(Y)]$ basée sur des données selon la densité g_{θ_0} , \mathbb{E} étant la fonction d’espérance mathématique et Y étant une variable aléatoire de densité f_{θ_0} c’est-à-dire $\mathbb{E}[\log f_{\theta}(Y)] = \int \log f_{\theta}(y) f_{\theta_0}(y) dy$. Soient Z_1, \dots, Z_n des mesures des temps de réponse des photons. On note les mêmes mesures ordonnées par ordre croissant par $Z_{(1)}, \dots, Z_{(n)}$. C’est-à-dire que $Z_{(1)}$ désigne le plus petit temps de réponse mesuré, $Z_{(2)}$ le deuxième plus petit et ainsi de suite. L’estimation de la log-vraisemblance est obtenue par une repondération de la log-vraisemblance $\sum_{i=1}^n w_{i,n} \log f_{\theta}(Z_{(i)})$ de la densité f_{θ} afin de corriger la distorsion, $w_{i,n}$ représentant le poids associé à la donnée $Z_{(i)}$. Dans cette phase de repondération, on donne un poids aux données $Z_{(i)}$ qui dépend de leurs positions temporelles. En d’autres termes, les données $Z_{(i)}$ sont ordonnées en fonction de leur valeur et leur poids dépend de leur ordre, c’est-à-dire que le poids des photons détectés Z_i dépend de leur ordre d’arrivée. En particulier, le temps d’arrivée $Z_{(n)}$ le plus élevé est associé au plus grand poids dans la fonction $\sum_{i=1}^n w_{i,n} \log f_{\theta}(Z_{(i)})$.

Dans la deuxième étape (B), on maximise la log-vraisemblance ainsi corrigée en utilisant un algorithme adapté, comme l’algorithme EM, abbréviation pour ‘Expectation-Maximization’, présenté dans le document de Dempster *et al.* (1977).

La méthode pour un mélange exponentiel avec ‘pile-up’

On présente par la suite un exemple de méthode d’estimation pour une application avec effet de ‘pile-up’ dans le cas simple d’un mélange de densités exponentielles. Puis on présente une méthode d’estimation pour une application avec une fonction d’appareil.

Dans une approche statistique avec ‘pile-up’ pour des mélanges exponentiels, on suppose que la distribution des durées de vie en fluorescence représente un mélange de lois exponentielles. On

considère la famille de densités $\{f_\theta, \theta \in \Theta\}$ donnée par la relation (C.1) suivante :

$$f_\theta(y) = \sum_{k=1}^K \frac{\alpha_k}{\tau_k} e^{-y/\tau_k}, \quad y \in \mathbb{R}_+, \quad (\text{C.1})$$

où $\tau_k > 0$ sont les paramètres exponentiels et les poids satisfont $\alpha_k > 0$ et $\sum_{k=1}^K \alpha_k = 1$. On note $\theta = (\alpha_1, \dots, \alpha_K, \tau_1, \dots, \tau_K)^T$ le vecteur de paramètres et Θ l'ensemble de paramètres θ . Les constantes de durées de vie en fluorescence sont données par les paramètres exponentiels τ_k . En plus, K désigne l'ordre du mélange exponentiel qui correspond au nombre de molécules différentes. On suppose que K est connue et fixe. On note F_θ la fonction de répartition associée à la densité f_θ donnée par $F_\theta(y) = \int_0^y f_\theta(t) dt$.

On note Y_1, Y_2, \dots une suite de variables aléatoires indépendantes de densité f_{θ_0} où $\theta_0 \in \Theta$ est le paramètre inconnu à estimer. Les Y_k représentent les temps d'arrivée des photons de fluorescence qui frappent le détecteur.

Le nombre N de photons qui frappent le détecteur par impulsion laser est modélisé par une loi de Poisson de paramètre λ (restreinte à $\{1, 2, \dots\}$). Les probabilités sont données par la relation suivante :

$$\mathbb{P}(N = n) = \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!(1 - e^{-\lambda})}, \quad n = 1, 2, \dots$$

On suppose que N est indépendant de la suite Y_1, Y_2, \dots . On définit alors l'observation avec 'pile-up' par

$$Z = \min\{Y_1, \dots, Y_N\}.$$

La mesure retenue Z correspond, comme indiqué précédemment, au temps de réponse le plus court.

La fonction de répartition avec 'pile-up' G_{θ_0} de la variable aléatoire Z est donnée par la relation suivante :

$$G_{\theta_0}(z) = \frac{1 - \exp\{-\lambda F_{\theta_0}(z)\}}{1 - e^{-\lambda}}, \quad z \in \mathbb{R}_+, \quad (\text{C.2})$$

et la densité avec 'pile-up' g_{θ_0} par la relation suivante :

$$g_{\theta_0}(z) = \frac{\lambda f_{\theta_0}(z) e^{-\lambda F_{\theta_0}(z)}}{1 - e^{-\lambda}}, \quad z \in \mathbb{R}_+. \quad (\text{C.3})$$

Pour effectuer l'estimation, la méthode selon l'invention approche la log-vraisemblance de f_θ par un estimateur basé sur des observations avec 'pile-up'. Ensuite, on obtient un estimateur du paramètre θ_0 en maximisant cette log-vraisemblance approchée. La forme simple de cette log-vraisemblance permet l'application de l'algorithme EM, défini par la suite, pour déterminer son maximum.

On procède ensuite à l'approximation de la log-vraisemblance de f_θ .

La log-vraisemblance de la fonction f_θ associée à un échantillon Y_1, \dots, Y_m de variables aléatoires indépendantes et identiquement distribuées (i.i.d) de densité f_{θ_0} est donnée par la relation suivante :

$$L_0(\theta) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \log f_\theta(Y_i),$$

et l'estimateur du maximum de vraisemblance classique θ_{ML} est défini par la relation suivante :

$$\theta_{\text{ML}} = \arg \max_{\theta \in \Theta} L_0(\theta) = \arg \max_{\theta \in \Theta} \sum_{i=1}^m \log f_{\theta}(Y_i). \quad (\text{C.4})$$

Il découle de la loi forte des grands nombres que $L_0(\theta)$ est un estimateur consistant de $\mathbb{E}[\log f_{\theta}(Y)]$. Si Z est une variable aléatoire de densité g_{θ_0} , on établit la propriété suivante en utilisant relation (C.3),

$$\begin{aligned} \mathbb{E}[\log(f_{\theta}(Y))] &= \int_0^{\infty} \log f_{\theta}(y) f_{\theta_0}(y) dy \\ &= \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda} \int_0^{\infty} \log f_{\theta}(y) e^{\lambda F_{\theta_0}(y)} g_{\theta_0}(y) dy \\ &= \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda} \mathbb{E}[\log f_{\theta}(Z) e^{\lambda F_{\theta_0}(Z)}]. \end{aligned}$$

On en déduit que la quantité

$$L_1(\theta; \theta_0) = \frac{1 - e^{-\lambda}}{n\lambda} \sum_{i=1}^n \log f_{\theta}(Z_i) e^{\lambda F_{\theta_0}(Z_i)}$$

est un estimateur consistant de $\mathbb{E}[\log f_{\theta}(Y)]$ basé sur un échantillon Z_1, \dots, Z_n i.i.d. de densité g_{θ_0} . Pourtant, la quantité $L_1(\theta; \theta_0)$ ne peut pas être utilisée pour estimer le paramètre inconnu θ_0 , car elle-même dépend de θ_0 . Or, une autre modification est indispensable. On déduit de la relation (C.2) que :

$$e^{-\lambda F_{\theta_0}(z)} = 1 - (1 - e^{-\lambda}) G_{\theta_0}(z).$$

En remplaçant $G_{\theta_0}(z)$ par la fonction de répartition empirique $\hat{G}_n(z) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbb{1}\{Z_i \leq z\}$, on établit un autre estimateur de $\mathbb{E}[\log f_{\theta}(Y_1)]$ similaire à $L_1(\theta; \theta_0)$ par

$$\begin{aligned} L(\theta) &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda(1 - (1 - e^{-\lambda}) \hat{G}_n(Z_i))} \log f_{\theta}(Z_i) \\ &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda(1 - (1 - e^{-\lambda}) \frac{i}{n})} \log f_{\theta}(Z_{(i)}), \end{aligned}$$

où $Z_{(i)}$ désigne la i -ème statistique d'ordre de Z_1, \dots, Z_n . On introduit les poids

$$w_{i,n} = \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda(1 - (1 - e^{-\lambda}) \frac{i}{n})}.$$

On définit un nouvel estimateur de θ_0 par

$$\hat{\theta}_n = \arg \max_{\theta \in \Theta} L(\theta) = \arg \max_{\theta \in \Theta} \sum_{i=1}^n w_{i,n} \log f_{\theta}(Z_{(i)}). \quad (\text{C.5})$$

Donc, on cherche le paramètre où la log-vraisemblance approchée atteint son maximum. On peut considérer $\hat{\theta}_n$ comme un estimateur de maximum de vraisemblance approché.

On remarque que l'on peut également utiliser d'autres estimateurs de la fonction de répartition que \hat{G}_n . Cela changera les poids $w_{i,n}$ qui sont associés aux données $Z_{(i)}$, mais le principe restera le même.

On effectue par la suite une maximisation par l'algorithme EM.

On constate que le problème de maximisation de la relation (C.5) diffère du problème de la relation (C.4) seulement par des constantes positives $w_{i,n}$. Or, la maximisation de la relation (C.4) peut se faire par l'algorithme EM. Grâce à la structure semblable des problèmes, l'algorithme EM s'applique également à la relation (C.5).

On introduit la variable manquante S d'une observation Y du mélange exponentiel f_θ étant l'étiquette de la composante du mélange qui a généré l'observation Y . Plus précisément, S est une variable aléatoire à valeurs dans $\{1, \dots, K\}$ et $\mathbb{P}(S = k) = \alpha_k$. La loi jointe de (Y, S) est donnée par

$$\pi_\theta(y, s) = \frac{\alpha_s}{\tau_s} e^{-y/\tau_s}, \quad y > 0, s \in \{1, \dots, K\}.$$

Comme dans l'algorithme EM classique, on définit la fonction

$$\begin{aligned} Q(\theta, \theta') &= \sum_{i=1}^n w_{i,n} \mathbb{E}_{\theta'} [\log \pi_\theta(Z_{(i)}, S) | Y = Z_{(i)}] \\ &= \sum_{i=1}^n w_{i,n} \sum_{k=1}^K \left(\log(\alpha_k) - \log \tau_k - \frac{Z_{(i)}}{\tau_k} \right) \mathbb{P}_{\theta'}(S = k | Y = Z_{(i)}), \end{aligned}$$

et on calcule itérativement la suite $(\theta^{(t)})_t$ en maximisant $Q(\theta, \theta^{(t)})$, conduisant à la relation suivante :

$$\theta^{(t+1)} = \arg \max_{\theta \in \Theta} Q(\theta, \theta^{(t)}).$$

Ce problème de maximisation est facile car il se décompose en plusieurs problèmes de maximisation indépendants:

$$\begin{aligned} \tau_l^{(t+1)} &= \arg \max_{\tau_l > 0} \sum_{i=1}^n w_{i,n} \left(-\log(\tau_l) - \frac{Z_{(i)}}{\tau_l} \right) \mathbb{P}_{\theta^{(t)}}(S = l | Y = Z_{(i)}), \\ (\alpha_1^{(t+1)}, \dots, \alpha_K^{(t+1)}) &= \arg \max_{\alpha_1, \dots, \alpha_K} \sum_{i=1}^n w_{i,n} \sum_{k=1}^K \log(\alpha_k) \mathbb{P}_{\theta^{(t)}}(S = k | Y = Z_{(i)}). \end{aligned}$$

où la dernière maximisation est faite sous la contrainte que tous les α_k sont à valeurs dans $]0, 1[$ et $\sum_k \alpha_k = 1$. On peut montrer qu'avec chaque itération la log-vraisemblance approchée $L(\theta)$ augmente. Plus précisément on a pour toute valeur initiale $\theta^{(1)} \in \Theta$ et pour tout $t \geq 1$,

$$L(\theta^{(t+1)}) \geq L(\theta^{(t)}).$$

Par ailleurs, on peut montrer que la suite $(\theta^{(t)})_t$ converge vers un point critique de $L(\theta)$.

Il y a plusieurs critères d'arrêt pour déterminer le moment quand la suite $(\theta^{(t)})_t$ a convergé et où on peut arrêter le calcul itératif. Un critère repose sur l'évolution de la log-vraisemblance approchée. On calcule la valeur de $L(\theta^{(t)})$ à toute itération et on s'arrête si l'accroissement par rapport à l'étape précédente est inférieur à un certain seuil. Un autre critère étudie la variation des valeurs du paramètre $\theta^{(t)}$. A toute itération on évalue la différence $\|\theta^{(t)} - \theta^{(t-1)}\|_\infty$ où $\|\cdot\|_\infty$ désigne la norme infinie. Si la différence est inférieure à un certain seuil, on considère la dernière valeur de $\theta^{(t)}$ comme limite de la suite $(\theta^{(t)})_t$.

L'algorithme EM pour maximiser la fonction $L(\theta)$ dans le cas d'un mélange exponentiel, peut être défini par les phases suivantes :

Algorithme dans le cas d'un mélange exponentiel

On fixe un seuil $\sigma > 0$ pour le critère d'arrêt.

Soit λ la valeur connue du paramètre Poissonien lors de l'expérience.

Soient Z_1, \dots, Z_n les observations avec 'pile-up', c'est-à-dire un échantillon i.i.d. de densité g_{θ_0} . On note $Z_{(1)}, \dots, Z_{(n)}$ les observations ordonnées, n étant le nombre total de mesures avec photons détectés, et i étant l'ordre d'arrivée du photon $Z_{(i)}$.

1. On pose $t = 1$.

On choisit une valeur initiale $\theta^{(1)} = (\alpha_1^{(1)}, \dots, \alpha_K^{(1)}, \tau_1^{(1)}, \dots, \tau_K^{(1)}) \in \Theta$.

On calcule, pour $i = 1, \dots, n$

$$w_{i,n} = \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda(1 - (1 - e^{-\lambda})^{\frac{i}{n}})}.$$

2. On réitère jusqu'à la convergence les étapes suivantes :

(a) Calculer les probabilités conditionnelles, pour $i = 1, \dots, n$ et $s = 1, \dots, K$,

$$p_{s,i} = \mathbb{P}_{\theta^{(t)}}(S = s | Y = Z_{(i)}) = \frac{\frac{\alpha_s^{(t)}}{\tau_s^{(t)}} e^{-Z_{(i)}/\tau_s^{(t)}}}{\sum_{k=1}^K \frac{\alpha_k^{(t)}}{\tau_k^{(t)}} e^{-Z_{(i)}/\tau_k^{(t)}}}.$$

(b) Déterminer les nouveaux paramètres, pour $s = 1, \dots, K$,

$$\alpha_s^{(t+1)} = \frac{\sum_{i=1}^n w_{i,n} p_{s,i}}{\sum_{i=1}^n w_{i,n}},$$

et

$$\tau_s^{(t+1)} = \frac{\sum_{i=1}^n Z_{(i)} w_{i,n} p_{s,i}}{\sum_{i=1}^n w_{i,n} p_{s,i}}.$$

On pose $\theta^{(t+1)} = (\alpha_1^{(t+1)}, \dots, \alpha_K^{(t+1)}, \tau_1^{(t+1)}, \dots, \tau_K^{(t+1)})$.

(c) D'après le critère d'arrêt choisi, on évalue

$$\sigma_{t+1} = \begin{cases} L(\theta^{(t+1)}) - L(\theta^{(t)}) \\ \|\theta^{(t+1)} - \theta^{(t)}\|_{\infty} \end{cases}.$$

(d) Si $\sigma_{t+1} < \sigma$, on passe à la phase 3 ci-dessous qui donne l'estimateur,

(e) dans le cas contraire, on pose $t = t + 1$ et on retourne à l'étape 2(a).

3. L'estimateur du paramètre θ_0 est donné par $\theta^{(t+1)}$.

La methode dans le cas avec fonction d'appareil

Le modèle précédent n'est que proche de la réalité pour des appareils de mesure avec un laser qui émet de la lumière instantanément, c'est-à-dire si l'impulsion laser peut être modélisée par une loi de Dirac avec toute la masse en zéro. Cependant, la source de lumière de la plupart des appareils de mesure émet de la lumière pendant une courte durée. On appelle fonction d'appareil la distribution de l'émission de lumière qui est différente pour tout appareil, mais qui peut être enregistrée facilement avant d'effectuer l'expérience. Donc une observation TCSPC est le temps que la molécule reste en état excité, la durée de vie, à laquelle s'ajoute une durée aléatoire qui provient de l'appareil. La méthode EM prend en compte les aléas dus à l'appareil.

On note η la densité de probabilité de la fonction d'appareil. On supposera dans la suite que η est connue. Soient $\{E_i, i \geq 1\}$ et $\{Y_i, i \geq 1\}$ deux suites indépendantes de variables aléatoires indépendantes de loi η respectivement du mélange exponentiel f_{θ_0} donnée par la relation (C.1).

On pose $\tilde{Y}_i = E_i + Y_i$.

La densité \tilde{f}_{θ_0} de \tilde{Y} est la convolution de f_{θ_0} et η , $\tilde{f}_{\theta_0} = f_{\theta_0} \star \eta$.

On note la fonction de répartition de \tilde{Y} par \tilde{F}_{θ_0} . Or, une observation en TCSPC a la même distribution que :

$$\tilde{Z} = \min\{\tilde{Y}_1, \dots, \tilde{Y}_N\}.$$

La fonction de répartition avec 'pile-up' de est donnée par :

$$\tilde{G}_{\theta_0}(z) = \frac{1 - \exp\{-\lambda \tilde{F}_{\theta_0}(z)\}}{1 - e^{-\lambda}}, \quad z \in \mathbb{R}_+,$$

et la densité avec 'pile-up' est donnée par :

$$\tilde{g}_{\theta_0}(z) = \frac{\lambda \tilde{f}_{\theta_0}(z) e^{-\lambda \tilde{F}_{\theta_0}(z)}}{1 - e^{-\lambda}}, \quad z \in \mathbb{R}_+.$$

De la même manière que précédemment, on déduit l'estimateur comme le vecteur θ qui maximise la log-vraisemblance approchée,

$$\tilde{\theta}_n = \arg \max_{\theta \in \Theta} \tilde{L}(\theta),$$

où $\tilde{Z}_1, \dots, \tilde{Z}_n$ désignent des observations avec 'pile-up' de densité \tilde{g}_{θ_0} et la log-vraisemblance approchée est donnée par

$$\tilde{L}(\theta) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w_{i,n} \log \tilde{f}_{\theta}(\tilde{Z}_{(i)}).$$

Pour l'observation $\tilde{Y} = Y + E$, on considère les deux variables manquantes (S, E) où S est l'étiquette de la composante du mélange qui a généré Y , et E désigne la durée ajouté à la durée de vie par l'appareil. La loi jointe de (\tilde{Y}, S, E) est donnée par :

$$\tilde{\pi}_{\theta}(y, s, u) = \eta(u) \frac{\alpha_s}{\tau_s} e^{-(y-u)/\tau_s}, \quad 0 < u < y, \quad s \in \{1, \dots, K\}.$$

L'algorithme EM pour maximiser $\tilde{L}(\theta)$ dans le cas d'une fonction d'appareil est défini par les phases suivantes:

Algorithme dans le cas d'une fonction d'appareil

On fixe un seuil $\sigma > 0$ pour le critère d'arrêt.

Soit λ la valeur connue du paramètre Poissonien lors de l'expérience.

Soit η une densité connue constante par morceaux donnée par

$$\eta(u) = \sum_{j=1}^p c_j \mathbb{1}_{\{u \in [h_{j-1}, h_j)\}} \cdot$$

Soient $\tilde{Z}_1, \dots, \tilde{Z}_n$ les observations avec 'pile-up', un échantillon i.i.d. de densité \tilde{g}_{θ_0} . On note $\tilde{Z}_{(1)}, \dots, \tilde{Z}_{(n)}$ les observations ordonnées.

1. On pose $t = 1$.

On choisit une valeur initiale $\theta^{(1)} = (\alpha_1^{(1)}, \dots, \alpha_{K-1}^{(1)}, \nu_1^{(1)}, \dots, \nu_K^{(1)}) \in \Theta$.

On calcule, pour $i = 1, \dots, n$,

$$w_{i,n} = \frac{1 - e^{-\lambda}}{\lambda(1 - (1 - e^{-\lambda})^{\frac{i}{n}})} \cdot$$

2. On réitère jusqu'à convergence les étapes suivantes :

(a) On calcule, pour $i = 1, \dots, n$ et $s = 1, \dots, K$,

$$\begin{aligned} q_{s,i} &= \frac{\alpha_s^{(t)}}{\tau_s^{(t)}} \int_0^{\tilde{Z}_{(i)}} \eta(u) e^{-(Z_{(i)}-u)/\tau_s^{(t)}} du \\ &= \alpha_s^{(t)} e^{-\tilde{Z}_{(i)}/\tau_s^{(t)}} \sum_{j=1}^p \mathbb{1}_{\{\tilde{Z}_{(i)} > h_{j-1}\}} c_j \left(e^{(h_j \wedge \tilde{Z}_{(i)})/\tau_s^{(t)}} - e^{h_{j-1}/\tau_s^{(t)}} \right) \end{aligned}$$

où $a \wedge b$ denotes the minimum of a and b , et on calcule

$$p_{s,i} = \mathbb{P}_{\theta^{(t)}}(S = s | \tilde{Y} = \tilde{Z}_{(i)}) = \frac{q_{s,i}}{\sum_{k=1}^K q_{k,i}},$$

et

$$\begin{aligned} \beta_{s,i} &= \frac{\alpha_s^{(t)}}{\tau_s^{(t)}} \int_0^{\tilde{Z}_{(i)}} u \eta(u) e^{-(Z_{(i)}-u)/\tau_s^{(t)}} du \\ &= \alpha_s^{(t)} e^{-\tilde{Z}_{(i)}/\tau_s^{(t)}} \sum_{j=1}^p \mathbb{1}_{\{\tilde{Z}_{(i)} > h_{j-1}\}} c_j \\ &\quad \times \left[\left(\tau_s^{(t)} - h_{j-1} \right) e^{\nu_s^{(t)} h_{j-1}} + \left((h_j \wedge \tilde{Z}_{(i)}) - \tau_s^{(t)} \right) e^{\nu_s^{(t)} (h_j \wedge \tilde{Z}_{(i)})} \right] \end{aligned}$$

(b) On détermine les nouveaux paramètres, pour $s = 1, \dots, K$,

$$\alpha_s^{(t+1)} = \frac{\sum_{i=1}^n w_{i,n} p_{s,i}}{\sum_{i=1}^n w_{i,n}},$$

et

$$\tau_s^{(t+1)} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{w_{i,n}}{\sum_{k=1}^K q_{k,i}} (Z_{(i)} q_{s,i} - \beta_{s,i})}{\sum_{i=1}^n w_{i,n} p_{s,i}}.$$

On pose $\theta^{(t+1)} = (\alpha_1^{(t+1)}, \dots, \alpha_{K-1}^{(t+1)}, \nu_1^{(t+1)}, \dots, \nu_K^{(t+1)})$.

(c) D'après le critère d'arrêt choisi, on évalue

$$\sigma_{t+1} = \begin{cases} \tilde{L}(\theta^{(t+1)}) - \tilde{L}(\theta^{(t)}) \\ \|\theta^{(t+1)} - \theta^{(t)}\|_\infty. \end{cases}$$

(d) Si $\sigma_{t+1} < \sigma$, passer à la phase (3) ci-dessous.

(e) Dans le cas contraire on pose $t = t + 1$ et on retourne à l'étape 2(a).

3. L'estimateur du paramètre θ_0 est donné par $\theta^{(t+1)}$.

La méthode dans le cas général

L'invention utilise l'algorithme précédent pour le problème inverse général évoqué précédemment, c'est-à-dire pour des familles de densité autres que la famille de mélanges exponentiels et pour d'autres lois discrètes que la loi de Poisson.

Ce nouvel algorithme EM, utilisé pour résoudre le problème inverse général, n'est donc pas restreint au mélange exponentiel et la loi de Poisson. On considère $\{f_\theta^*, \theta \in \Theta\}$ une famille de densités quelconque telle que l'algorithme EM s'applique à un échantillon i.i.d. de densité $f_{\theta_0}^*$. Soient $\{Y_k^*, k \geq 1\}$ une suite de variables aléatoires indépendantes de densité $f_{\theta_0}^*$. On note F_θ^* la fonction de répartition associée à la densité f_θ^* .

On considère N^* une variable aléatoire à valeurs dans $\{1, 2, \dots\}$ indépendante de la suite $\{Y_k^*, k \geq 1\}$. On note m la fonction génératrice de N^* ,

$$m(u) = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbb{P}(N^* = n) u^n, \quad u \in [0, 1].$$

et m' la dérivée de m . On définit l'observation avec 'pile-up' par:

$$Z^* = \min\{Y_1^*, \dots, Y_{N^*}^*\}.$$

On établit la log-vraisemblance approchée basée sur des observations $Z_1^* \dots, Z_n^*$ i.i.d. avec 'pile-up' :

$$L^*(\theta) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n w_{i,n}^* \log(f_\theta^*(Z_{(i)}^*)),$$

où

$$w_{i,n}^* = \frac{1}{m'(m^{-1}(1 - \frac{i}{n}))}.$$

On définit

$$Q^*(\theta, \theta') = \sum_{i=1}^n w_{i,n}^* \mathbb{E}_{\theta'} \left[\log(\pi_{\theta}^*(Z_{(i)}^*, \mathbf{S})) | Y^* = Z_{(i)}^* \right],$$

où \mathbf{S} dénote les variables manquante associées à la variable Y^* , et π_{θ}^* désigne la densité jointe de (Y^*, \mathbf{S}) .

L'algorithme EM général pour maximiser $L^*(\theta)$ comporte les phases suivantes:

Algorithme général

On fixe un seuil $\sigma > 0$ pour le critère d'arrêt.

1. On choisit une valeur d'initialisation $\theta_1 \in \Theta$. On pose $t = 1$.
2. On réitère jusqu'à la convergence les étapes suivantes :
 - (a) On pose $t = t + 1$.
 - (b) On calcule $\theta^{(t)} = \arg \max_{\theta \in \Theta} Q^*(\theta, \theta^{(t-1)})$.
 - (c) D'après le critère d'arrêt choisi, on évalue

$$\sigma_t = \begin{cases} L^*(\theta^{(t)}) - L^*(\theta^{(t-1)}) \\ \|\theta^{(t)} - \theta^{(t-1)}\|_{\infty} \end{cases}.$$

- (d) Si $\sigma_t < \sigma$ on passe à la phase (3) ci-dessous, sinon on retourne à l'étape 2(a).
3. L'estimateur du paramètre θ_0 est donné par $\theta^{(t)}$.

Avantages de la méthode

Une méthode d'estimation selon l'invention peut fournir des mesures très précises quand elle est appliquée à des données réelles. Elle demande peu de temps de calcul, prend en compte la fonction d'appareil, est facile à mettre en œuvre et peut traiter le cas d'un mélange de plusieurs exponentielles.

En comparaison avec des méthodes existantes, elle est notamment adaptée à la distorsion non linéaire du problème général. En particulier, on peut appliquer les résultats indiqués dans Rebafka *et al.* (2008), concernant le réglage optimal de l'intensité du laser. En d'autres termes, l'expérience peut être effectuée sous des conditions optimales et ainsi une réduction du temps d'acquisition, d'un facteur 10 par exemple, peut être atteinte par rapport aux techniques actuellement utilisées.

Le système à caractériser peut être composé de molécules comme décrit précédemment. L'invention peut néanmoins s'appliquer à d'autres systèmes. Un système à caractériser peut être par exemple une fibre optique dans laquelle on injecte des photons et dont mesure les durées de vie. D'autres types de particules que les photons peuvent aussi être utilisés.

C.3 REVENDICATIONS DU BREVET

1. Procédé d'estimation des paramètres θ_0 de la distribution des temps de réponse de particules réémises par un système, en réponse à une série d'émissions de particules vers ledit système, un temps de réponse d'une particule correspondant étant mesuré entre un instant d'émission et l'instant de détection de ladite particule, caractérisé en ce que le procédé comporte au moins :
 - une étape (A) de détermination d'une fonction approchant la log-vraisemblance de la distribution cible f_{θ_0} correspondant à une distribution sans effet d'empilement à partir des mesures de temps de réponse de particules détectées avec effet d'empilement, c'est-à-dire des mesures de la distribution g_{θ_0} ;
 - une étape (B) de maximisation de la log-vraisemblance approchée sur l'ensemble des paramètres Θ afin de déterminer l'estimateur comme le vecteur θ qui maximise la log-vraisemblance approchée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la fonction approchée est une estimation de la log-vraisemblance de la fonction de distribution cible f_{θ_0} basée sur des mesures observées distribuées selon la fonction de distribution g_{θ_0} avec effet d'empilement.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la fonction approchée est obtenue par une pondération de la log-vraisemblance de la fonction de distribution cible f_{θ_0} .
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la pondération de la log-vraisemblance se fait de façon à ordonner les mesures de temps de réponse observées Z_1, \dots, Z_n en fonction de l'ordre d'arrivée des particules correspondante, le poids affecté à chaque mesure dépendant de son ordre.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le poids affecté à une mesure croît avec son ordre d'arrivée associé.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que n étant le nombre total de particules détectées et i étant l'ordre d'arrivée d'une particule, le poids $w_{i,n}^*$ associé à la mesure du temps de réponse $Z_{(i)}$ d'une particule d'ordre i est donné par la relation suivante :

$$w_{i,n}^* = \frac{1}{m'(m^{-1}(1 - \frac{i}{n}))} .$$

où m note la fonction génératrice de N ,

$$m(u) = \sum_{n=1}^{\infty} \mathbb{P}(N^* = n)u^n, \quad u \in [0, 1] .$$

et m' la dérivée de m et \hat{G}_n est un estimateur de la fonction de répartition.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fonction de distribution cible f_{θ_0} est considérée comme étant un mélange de densités exponentielles.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fonction de distribution cible prend en compte la fonction d'appareil de mesures, la fonction cible étant le produit de convolution de la fonction cible sans fonction d'appareil (f_{θ_0}) avec la densité de probabilité de la fonction d'appareil η .
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les particules sont des photons émis par un laser, le système réémettant des photons.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le système est un ensemble de molécules à caractériser par la fonction de distribution cible des temps de réponse.

BIBLIOGRAPHY

- BALABDAOUI, F. & WELLNER, J. A. (2004). Mixtures and monotonicity: a review of estimation under monotonicity constraints. *IMS Lecture Notes - Monograph Series* .
- BERBERAN-SANTOS, M. N., BODUNOV, E. N. & VALEUR, B. (2005a). Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential). *Chemical Physics* **515**, 171–182.
- BERBERAN-SANTOS, M. N., BODUNOV, E. N. & VALEUR, B. (2005b). Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions: 2. Becquerel (compressed hyperbola) and related decay functions. *Chemical Physics* **317**, 57–62.
- BÖHNING, D. (2000). *Computer-Assisted Analysis of Mixtures and Applications: Meta-analysis, disease mapping and others*. New York: Chapman & Hall/CRC.
- BICKEL, P. J. & DOKSUM, K. A. (2001). *Mathematical Statistics, vol. I*. Prentice Hall.
- BICKEL, P. J., KLAASSEN, C. A. J., RITOV, Y. & WELLNER, J. A. (1998). *Efficient and Adaptive Estimation for Semiparametric Models*. New York: Springer Verlag.
- BILLINGSLEY, P. (1999). *Convergence of Probability Measures*. John Wiley & Sons Inc, 2nd ed.
- BROCHON, J. C. (1994). Maximum entropy method of data analysis in time-resolved spectroscopy. *Methods Enzymology* **240**, 262–311.
- BRUNS, T., STRAUSS, W. S. & SCHNECKENBURGER, H. (2007). Cell membrane fluidity determined by fluorescence lifetime and polarization screening. In: *Advances in Medical Engineering* (BUZUG, T. M., ed.), no. 114 in Springer Proceedings in Physics. Springer.
- CARROLL, R. J. & RUPPERT, D. (1988). *Transformation and weighting in regression*. London: Chapman & Hall.
- CHANDRA, S. (1977). On the mixtures of probability distributions. *Scandinavian Journal of Statistics* **4**(3), 105–112.
- COATES, P. B. (1968). The correction of photon ‘pile-up’ in the measurement of radiative lifetimes. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* **1**, 878–879.
- CRISSMAN, H. A. & STEINKAMP, J. A. (2000). Flow cytometric fluorescence lifetime measurements. In: *Cytometry* (DARZYNKIEWICZ, Z., ROBINSON, J. P. & CRISSMAN, H. A., eds.), vol. 63, chap. 6. Academic Press, 3rd ed.
- DEMAS, J. N. (1983). *Excited State Lifetime Measurements*. New York: Academic Press.

- DEMPSTER, A. P., LAIRD, N. M. & RUBIN, D. B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **39**(1), 1–38.
- DEVORE, R. A. & LORENTZ, G. G. (1993). *Constructive Approximation*. Springer.
- DEVROYE, L. (1986). *Non-Uniform Random Variate Generation*. Springer.
- FELLER (1971). *An Introduction to Probability Theory and Its Applications*, vol. 2. New York: Wiley, 2nd ed.
- GAFNI, A., MODLIN, R. L. & BRAND, L. (1975). Analysis of fluorescence decay curves by means of the Laplace transformation. *Biophysical Journal* **15**(3), 263–280.
- GAVIOLA, Z. (1926). Ein Fluorometer. Apparat zur Messung von Fluoreszenzabklingungszeiten. *Zeitschrift für Physik* **42**, 853–861.
- GELMAN, A., CARLIN, J. B., STERN, H. S. & RUBIN, D. B. (2003). *Bayesian Data Analysis, Second Edition*. Chapman & Hall/CRC.
- GILL, R. & LEVIT, B. (1995). Applications of the van Trees inequality: a Bayesian Cramér-Rao bound. *Bernoulli* **1**(1/2), 59–79.
- GOUTIS, C. (1997). Nonparametric estimation of a mixing density via the kernel method. *Journal of the American Statistical Association* **92**(440), 1445–1450.
- GRATTON, E., LIMKEMAN, M., LAKOWICZ, J., MALIWAL, B., CHEREK, H. & LACZKO, G. (1984). Resolution of mixtures of fluorophores using variable-frequency phase and modulation data. *Biophysical Journal* **46**(4), 479–486.
- GREEN, P. J. (1995). Reversible jump markov chain monte carlo computation and bayesian model determination. *Biometrika* **82**, 711–732.
- GRINVALD, A. & STEINBERG, I. Z. (1974). Fast relaxation processes in a protein revealed by the decay kinetics of tryptophan fluorescence. *Biochemistry* **13**(25), 5170–5178.
- GRUET, M.-A., PHILIPPE, A. & ROBERT, C. P. (1999). MCMC control spreadsheets for exponential mixture estimation. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **8**(2), 298–317.
- HALL, P. & SELINGER, B. (1981). Better estimates of exponential decay parameters. *Journal of Physical Chemistry* **85**(20), 2941–2946.
- HENGARTNER, N. W. (1997). Adaptive demixing in poisson mixture models. *The Annals of Statistics* **25**(3), 917–928.
- HUNT, B. R. (1971). Biased estimation of nonparametric identification of linear systems. *Mathematical Biosciences* **10**, 215–237.
- ISENBERG, I. & DYSON, R. (1969). The analysis of fluorescence decay by a method of moments. *Biophysical Journal* **9**, 1337–1350.
- JEWELL, N. P. (1982). Mixtures of exponential distributions. *The Annals of Statistics* **10**(2), 479–484.

- JISKOOT, W., VISSER, A. J., HERRON, J. N. & SUTTER, M. (2005). Fluorescence spectroscopy. In: *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals* (JISKOOT, W. & CROMMELIN, D. J. A., eds.), chap. 2. Springer.
- KALLENBERG, O. (2002). *Foundations of modern probability*. Probability and its Applications (New York). New York: Springer, second ed.
- KIEFER, J. & WOLFOWITZ, J. (1956). Consistency of the maximum likelihood estimator in the presence of infinitely many incidental parameters. *The Annals of Mathematical Statistics* **27**(4), 887–906.
- KOECHLIN, Y. (1961). Ph.D. thesis, Paris.
- LAIRD, N. (1978). Nonparametric maximum likelihood estimation of a mixing distribution. *Journal of the American Statistical Association* **73**(364), 805–811.
- LAKOWICZ, J., LACZKO, G., CHEREK, H., GRATTON, E. & LIMKEMAN, M. (1984). Analysis of fluorescence decay kinetics from variable-frequency phase shift and modulation data. *Biophysical Journal* **46**(4), 463 – 477.
- LAKOWICZ, J. R. (ed.) (1991). *Topics in Fluorescence Spectroscopy - Volume 1 Techniques*. Springer.
- LAKOWICZ, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Academic/Plenum.
- LANGE, K. (1995). A gradient algorithm locally equivalent to the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**(2), 425–437.
- LINDSAY, B. G. (1983). The geometry of mixture likelihoods: A general theory. *The Annals of Statistics* **11**(1), 86–94.
- LINDSAY, B. G. (1995). *Mixture Models: Theory, Geometry and Applications*. NFS-CBMS Regional Conference Series in Probability and Statistics. Hayward CA: Institute of Mathematical Statistics.
- LITTLE, R. J. A. & RUBIN, D. B. (2002). *Statistical Analysis with Missing Data*. Wiley-Interscience, 2 ed.
- LIVESEY, A. K. & BROCHON, J. C. (1987). Analyzing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method. *Biophysical Journal* **52**(5), 693–706.
- MARIN, J.-M., MENGERSEN, K. & ROBERT, C. P. (2005). Bayesian modelling and inference on mixtures of distributions. In: *Handbook of Statistics* (DEY, D. & RAO, C., eds.), vol. 25, chap. 16. Elsevier-Sciences.
- MARIN, J.-M. & ROBERT, C. P. (2007). *Bayesian core: a practical approach to computational Bayesian statistics*. New York: Springer.
- MARQUARDT, D. W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *SIAM Journal on Applied Mathematics* **11**(2), 431–441.
- MARRON, J. S. & WAND, M. P. (1992). Exact mean integrated squared error. *The Annals of Statistics* **20**(2), 712–736.

- MCKINNON, A. E., SZABO, A. G. & MILLER, D. R. (1977). The deconvolution of photoluminescence data. *Journal of Physical Chemistry* **81**(16), 1564–1570.
- MCLACHLAN, G. & PEEL, D. (2000). *Finite Mixture Models*. Wiley Series in Probability and Statistics. Wiley-Interscience.
- O’CONNOR, D. V. & PHILLIPS, D. (1984). *Time-correlated single photon counting*. London: Academic Press.
- O’CONNOR, D. V., WARE, W. R. & ANDRE, J. C. (1979). Deconvolution of fluorescence decay curves. A critical comparison of techniques. *Journal of Physical Chemistry* **83**(10), 1333–1343.
- OKANO, L., TEDESCO, A., TOUSO, A., OLIVEIRA, D., MAEDER, M. & BRINN, I. (2005). Abstracting reliable parameters from time-correlated single photon counting experiments. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **175**, 221–225.
- PATTING, M., WAHL, M., KAPUSTA, P. & ERDMANN, R. (2007). Dead-time effects in TCSPC data analysis. In: *Proceedings of SPIE*, vol. 6583.
- PEARSON, K. (1894). Contributions to the mathematical theory of evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **A185**, 71–110.
- PHILIPPE, A. (1997). Processing simulation output by riemann sums. *The Journal of Statistical Computation and Simulation* **59**, 295–314.
- PILLA, R. S., BARTOLUCCI, F. & LINDSAY, B. G. (2006). Model building for semiparametric mixtures. Available at [arXiv.org:math/0606077](http://arXiv.org/math/0606077).
- PILLA, R. S. & LINDSAY, B. G. (2001). Alternative EM methods for nonparametric finite mixture models. *Biometrika* **8**(2), 535–550.
- PIN, J.-P., AYOUB, M.-A., MAUREL, D., PERROY, J. & TRINQUET, E. (2007). Energy transfer technologies to monitor the dynamics and signaling properties of G-protein-coupled receptors in living cells. In: *Biophysical analysis of membrane proteins: investigating structure and function* (PEBAY-PEYROULA, E., ed.), chap. 13. Wiley-VCH.
- POLLARD, D. (1985). New ways to prove central limit theorems. *Econometric Theory* **1**(3), 295–313.
- POLLARD, D. (2001). Hellinger differentiability. Available at <http://www.stat.yale.edu/pollard/Paris2001/Lectures/DQM.pdf>.
- RAICU, V. & POPESCU, A. (2008). *Integrated Molecular and Cellular Biophysics*. Springer.
- REBAFKA, T. (2007). An MCMC approach for estimating a fluorescence lifetime with pile-up distortion. In: *GRETSI 2007: 21ème colloque sur le traitement du signal et des images*. Troyes, France.
- REBAFKA, T. & ROUEFF, F. (2009). Minimax estimation of the mixing density of a mixture of exponential distributions. Working paper.
- REBAFKA, T., ROUEFF, F. & SOULOUMIAC, A. (2008). Information bounds and MCMC parameter estimation for the pile-up model. Submitted.

- REBAFKA, T., ROUEFF, F. & SOULOUMIAC, A. (2009a). A corrected likelihood approach for the pile-up model with application to fluorescence lifetime measurements using exponential mixtures. Submitted.
- REBAFKA, T., ROUEFF, F. & SOULOUMIAC, A. (2009b). Désempilement de mesures de temps de réponse par un algorithme E.M. modifié. In: *GRETSI 2009: 22ème colloque sur le traitement du signal et des images*.
- REBAFKA, T., ROUEFF, F. & SOULOUMIAC, A. (2009c). Procédé d'estimation des paramètres de la distribution des temps de réponse de particules d'un système, appliqué notamment aux mesures de fluorescence. Patent Number 09 00524.
- REDNER, R. & WALKER, H. (1984). Mixture densities, maximum likelihood and the em algorithm. *SIAM Review* **26**(2), 195–239.
- ROBERT, C. P. & CASELLA, G. (2004). *Monte Carlo Statistical Methods*. New York: Springer.
- ROUEFF, F. & RYDEN, T. (2005). Nonparametric estimation of mixing densities for discrete distributions. *The Annals of Statistics* **33**, 2066–2108.
- ROYER, C. A. (1995). Fluorescence spectroscopy. In: *Protein Stability and Folding: Theory and Practice* (SHIRLEY, B. A., ed.), chap. 3. Humana Press.
- RYAN, T. P. (2008). *Modern Regression Methods*. John Wiley and Sons, 2nd ed.
- SERDYUK, I. N., ZACCAI, N. R. & ZACCAI, J. (2007). *Methods in molecular biophysics: structure, dynamics, function*. Cambridge University Press.
- SERFLING, R. J. (1984). Generalized L-, M-, and R-statistics. *The Annals of Statistics* **12**(1), 76–86.
- SHAO, J. (2003). *Mathematical Statistics*. New York: Springer Verlag.
- SHORACK, G. R. (2000). *Probability for Statisticians*. New York: Springer Verlag.
- SOULOUMIAC, A. (2007). Apparatus and method for characterizing a system for counting elementary particles. Patent number WO2007088173 (A1).
- STIGLER, S. M. (1986). *The history of statistics: The measurement of Uncertainty before 1900*. Cambridge: Harvard University Press.
- STOKES, G. G. (1852). On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **142**, 463–562.
- TANNER, M. A. & WONG, W. H. (1987). The calculation of posterior distributions by data augmentation. *Journal of the American Statistical Association* **82**(398), 528–540.
- TEICHER, H. (1961). Identifiability of mixtures. *The Annals of Mathematical Statistics* **32**(1), 244–248.
- TEICHER, H. (1963). Identifiability of finite mixtures. *The Annals of Mathematical Statistics* **34**(4), 1265–1269.
- TITTERINGTON, D., SMITH, A. & MAKOV, U. (1985). *Statistical Analysis of Finite Mixture Distributions*. John Wiley & Sons.

- VALEUR, B. (1978). Analysis of time-dependent fluorescence experiments by the method of modulating functions with special attention to pulse fluorometry. *Chemical Physics* **30**(1), 85–93.
- VALEUR, B. (2002). *Molecular Fluorescence*. Weinheim: Wiley-VCH.
- VALEUR, B. (2004). *Fluorescence moléculaire*. De Boeck & Larcier.
- VAN DE VEN, M., AMELOOT, M., VALEUR, B. & BOENS, N. (2005). Pitfalls and their remedies in time-resolved fluorescence spectroscopy and microscopy. *Journal of Fluorescence* **15**(3), 377–412.
- VAN DER VAART, A. W. (1998). *Asymptotic Statistics*. Cambridge University Press.
- WALKER, J. G. (2002). Iterative correction for 'pile-up' in single-photon lifetime measurements. *Optics Communications* **201**, 271–277.
- WARE, W. R., DOEMENY, L. J. & NEMZEK, T. L. (1973). Deconvolution of fluorescence and phosphorescence decay curves. Least-squares method. *The Journal of Physical Chemistry* **77**(17), 2038–2048.
- WASSERMAN, L. (2007). *All of Nonparametric Statistics*. Springer.
- WU, J. F. J. (1983). On the convergence properties of the EM algorithm. *The Annals of Statistics* **11**(1), 95–103.
- ZHANG, C.-H. (1990). Fourier methods for estimating mixing densities and distributions. *The Annals of Statistics* **18**, 806–831.
- ZHANG, C.-H. (1995). On estimating mixing densities in discrete exponential family models. *The Annals of Statistics* **23**, 929–945.