

Détection d'objets 3D coalescents en microscopie confocale

Juhui WANG

L3I, Université de La Rochelle, 17000 La Rochelle.

Alain TRUBUIL

INRA, Unité de Biométrie, 78352 Jouy-en-Josas

Christine GRAFFIGNE

Université de Paris V, UFR de Mathématiques et Informatique, 75270 Paris

Résumé : *Dans cette communication, nous présentons une méthode de détection d'objets 3D coalescents à partir d'images issues de la microscopie confocale. La méthode développée est basée sur un modèle photométrique des objets. Notre but est de définir une approche simple et efficace permettant la prise en compte explicite de l'écart pouvant exister entre les données et le modèle. Les outils utilisés sont les statistiques non-paramétriques. La démarche a été mise en œuvre sur des glandes coliques de rats.*

Abstract : *In this paper, we present a method for 3D aggregated object detection from confocal fluorescence microscopy imaging. The developed method exploits a photometric model of the observed objects. Our aim is to define an efficient, but low computing complexity approach able to take into account the bias which may exist between the data and the model. The developed method is based on non-parametric statistics and has been applied to the study of spatial distribution of nuclei inside intestinal crypts of rats.*

1 Introduction

La microscopie confocale a suscité un regain d'intérêt depuis ces dernières années dans le domaine de la biologie, de la médecine et de la physique des matériaux et s'est imposé récemment comme un des principaux moyens d'investigation volumique et temporelle de spécimens vivants. Elle permet le découpage optique en profondeur d'un échantillon translucide. Cette technique permet d'effectuer des observations multidimensionnelles directes sur des spécimens vivants.

Du fait de la similitude existante entre les images issues de la microscopie confocale et celles issues d'autres technologies d'observation classiques qu'elles soient optiques, ultrasoniques, ou de résonance magnétique, etc., il est tentant de reproduire, sur des images en mi-

croscopie confocale, les travaux accomplis sur d'autres types d'images. Cependant, à l'exception de quelques articles sur la restauration [9], très peu de travaux ont été publiés sur ce thème, en raison des grandes difficultés de la tâche [1, 7, 11] : la structure de l'objet observé est souvent complexe, les objets sont fortement coalescents, leur observation est souvent partielle et on veut appréhender l'objet 3D. Tous ces facteurs compliquent le traitement proposé et compromettent la qualité des résultats obtenus. Par exemple, G. Gong et B. Parvin [3] ont proposé une méthode de segmentation basée sur le groupement des primitives locales (contour et ligne de crête) tout en intégrant la structure géométrique de l'objet observé (forme hyperquadrique). Même si seul un plan 2D de l'image a été prise en compte, le résultat n'a pas été tout à fait satisfaisant à cause d'un bruit trop important et de la trop grande variabilité géométrique des objets observés. Il nous est donc apparu nécessaire de développer des méthodes adaptées au type d'images rencontrées, en particulier en biologie cellulaire, acquises à l'aide de la microscopie confocale.

L'objectif de cette étude est de chercher à comprendre la structure intrinsèque des objets observés et les spécificités de l'imagerie en microscopie confocale, et de les intégrer, de façon explicite, dans la procédure de traitement. La méthode proposée est fondée sur des statistiques inférentielles. Tout d'abord, les variabilités photométriques des objets 3D observés sont décrites à l'aide d'un modèle probabiliste dans lequel la luminance de l'objet est supposée Gaussienne. Cependant, l'espérance statistique dépend de la position de l'objet dans le volume. Ce modèle n'est pas toujours valide pour analyser les données réelles. Sans la prise en compte explicite de cette inadéquation de donnée-modèle, nous pourrions aboutir à des résultats d'analyse aberrants. Afin de s'affranchir de cette difficulté, nous cherchons donc à sélectionner les zones dans lesquelles le modèle est valide. Cette sélection a été réalisée à l'aide d'une méthode d'inférence non-

paramétrique basée sur une loi du χ^2 .

Suite à cette première étape, les régions de l'objet 3D, qui correspondent au modèle supposé, sont localisées. Nous les appelons *germes*. Un *germe* est donc un ensemble de voxels déclarés compatibles avec le modèle photométrique de l'objet 3D. Un objet peut contenir plusieurs *germes*. Pour pouvoir individualiser les objets, il faut regrouper les *germes*. Nous accomplissons cette tâche selon un schéma d'agrégation itérative. Notons la généricité de la démarche développée même si à des fins d'illustration, nous limitons volontairement la présentation aux observations effectuées sur les glandes coliques de rat pour lesquelles les objets 3D recherchés sont les noyaux des cellules.

Le reste de cet article est organisé de la façon suivante : après avoir formulé un modèle statistique qui permet de représenter les caractéristiques photométriques du noyau, nous allons d'abord valider ce modèle par rapport aux données observées puis discerner les noyaux. Dans la dernière partie, nous présentons quelques résultats ainsi que des perspectives à court terme.

2 Modèle photométrique du noyau

Soit \mathcal{C} l'ensemble de noyaux de la glande et $c \in \mathcal{C}$ un noyau particulier. La luminance au sein d'un noyau est quasi-constante [11]. Cette valeur constante est bien sûr liée à la position du noyau dans l'image, nous la notons μ_c .

Soit I l'image à traiter et p la position d'un voxel défini dans l'image 3D, I_c la restriction de I sur le noyau c , et ϵ le modèle de bruit associé à l'image. Si nous supposons que ϵ est un bruit blanc Gaussien centré et indépendant de p , nous avons :

$$I_c(p) = \mu_c + \epsilon \quad \forall p \in c, \text{ avec } \epsilon \sim N(0, \sigma^2). \quad (1)$$

3 Détection de la partie interne des noyaux

Une fois le modèle du noyau précisé, la détection de la partie interne des noyaux est simple et peut être abordée au moyen d'un test hypothèse symétrique. Selon le modèle défini dans l'équation (1), une condition nécessaire pour qu'un ensemble de voxels soit situé à l'intérieur d'un noyau c est que : la luminance d'un quelconque voxel de cet ensemble suit une distribution Gaussienne d'espérance statistique égale à μ_c et d'écart-type égal à σ .

Soit $\nu(c)$ le nombre de voxels dans c . Nous avons :

$$\frac{\hat{\sigma}_c^2}{\sigma^2} \sim \chi^2(\nu(c) - 1) \quad (2)$$

où $\hat{\sigma}_c^2$ désigne l'estimateur empirique de la variance calculée sur c . Le paramètre σ^2 peut être soit ajusté manuellement soit calculé, de façon itérative, selon l'équation $\sigma^2 = \max_{c \in \mathcal{C}} \hat{\sigma}_c^2$.

La détection des noyaux se ramène donc à un problème de test d'hypothèse classique pour lequel l'hypothèse nulle est :

$$H_0 : \forall p \in c : I(p) = \mu_c \quad (3)$$

avec μ_c une constante inconnue.

Le critère de sélection peut être formulé de la façon suivante :

$$\sigma^2 \cdot \chi_{0.95}^2 < \hat{\sigma}_c^2 < \sigma^2 \cdot \chi_{0.05}^2 \quad (4)$$

Les valeurs de χ^2 sont choisies de façon à ce que le niveau de confiance soit supérieur ou égal à 95%. Un voxel est déclaré comme faisant partie d'un noyau si et seulement si le critère (4) est vérifié, et les noyaux sont discernés par la recherche des ensembles les plus grands de voxels voisins qui vérifient le critère (4).

L'application systématique de cette démarche ne donne pas des résultats satisfaisants à cause de la présence des taches à l'intérieur de noyau. Ces taches ne sont pas compatibles avec le reste du noyau et sont incohérentes avec le modèle (1). L'origine de ces taches peut être liée à la procédure de préparation des échantillons biologiques et à la procédure d'acquisition. Ces taches doivent être prises en compte dans la suite du traitement.

Cette difficulté peut être partiellement levée selon différentes stratégies reposant soit sur des pré-traitements [6], soit sur des statistiques robustes [2]. Ici nous développons une stratégie basée sur la validation de modèle [10, 4] qui permet non seulement d'éliminer les aberrations de données liées aux taches mais aussi les erreurs liées à la modélisation. Pour cela, nous déplaçons un cube de taille fixe dans le volume de la glande colique, et nous cherchons à appliquer le test (3) sur les voxels englobés par ce cube. Par commodité, on appelle *germes* les cubes valides. Bien sûr, il peut y avoir plusieurs *germes* à l'intérieur d'un noyau. Notons que la taille du cube utilisée est de $5 \times 5 \times 3$ et que le paramètre σ^2 a été ajusté manuellement. La valeur 21 pour σ^2 semble donner des résultats satisfaisants.

4 Étiquetage des noyaux

Après la première phase, nous avons obtenu un ensemble de *germes* situés à l'intérieur des noyaux. Un

noyau peut contenir plusieurs *germes*. La suite du travail consiste à regrouper, en une seule entité, l'ensemble de *germes* faisant partie d'un même noyau.

Étant donné deux ensembles de *germes* G et F , on pose comme condition nécessaire d'appartenance à un même noyau c , la vérification des propriétés suivantes:

1. $\hat{\mu}_G = \hat{\mu}_F$ avec $\hat{\mu}_G, \hat{\mu}_F$ représentant les estimateurs empiriques de μ_c basés sur G et F .
2. il n'existe pas d'éléments de surface des noyaux entre les deux volumes englobant les *germes* de G et de F .
3. le volume englobant à la fois les *germes* de G et ceux de F ne dépasse pas celui du noyau le plus grand.

Selon l'hypothèse formulée dans l'équation (1), la première condition est prise en compte à l'aide d'un test d'hypothèse basé sur la loi de *Student* suivante :

$$\frac{\hat{\mu}_G - \hat{\mu}_F}{\sqrt{\hat{\sigma}_{GF}^2}} \sim t(\nu(G) + \nu(F) - 2) \quad (5)$$

avec $\hat{\sigma}_G^2 = \sum_{p \in G} (I(p) - \hat{\mu}_G)^2 / \nu(G)$, $\hat{\sigma}_F^2 = \sum_{p \in F} (I(p) - \hat{\mu}_F)^2 / \nu(F)$ et $\hat{\sigma}_{GF}^2 = \frac{(\nu(G)-1)\hat{\sigma}_G^2 + (\nu(F)-1)\hat{\sigma}_F^2}{\nu(G)+\nu(F)-2} [\frac{1}{\nu(G)} + \frac{1}{\nu(F)}]$.

La deuxième condition est prise en compte plus simplement :

$$\left(\sum_{p \in G \cup F} 1_{\mathcal{E}}(p) \right) < T_0 \quad (6)$$

où T_0 est une valeur seuil et $1_{\mathcal{E}}$ la fonction indicatrice de la surface \mathcal{E} des noyaux de la glande. Notons que la surface des noyaux n'est pas connue *a priori*; nous avons estimé \mathcal{E} à partir des contours extraits de l'image [8]. $1_{\mathcal{E}}(p)$ prend la valeur 1 si p est sur un contour calculé de l'image et 0 sinon.

La prise en compte de la troisième condition a été réalisée à l'aide d'un système de voisinage. Étant donné deux ensembles de *germes* G et F , ceux-ci peuvent être regroupés au sein d'un même noyau seulement s'il existe un ellipsoïde S_{GF} , de taille prédéfinie, qui englobe tous les *germes* contenus dans G et F .

Deux ensembles de *germes* G et F sont regroupés si et seulement si les trois conditions précédentes sont satisfaites.

5 Résultats et discussion

L'algorithme développé a été testé sur des séquences d'images de glandes coliques de rats. Deux de ces résultats sont reportés ici. Les *Fig.1 (a) et (b)* montrent les résultats de la détection des *germes* projetés

sur les images originales. Les noyaux sont les structures plus ou moins elliptiques et foncées, et les *germes* détectés sont les pixels associés aux petits carrés blancs. Le cube utilisé est de taille $5 \times 5 \times 3$, ce qui correspond à peu près à un 30ème du volume moyen des noyaux. La valeur de σ^2 utilisée est de 21. Nous pouvons observer la présence de nombreuses taches entre les *germes*, à l'intérieur d'un noyau. Notons qu'avant d'appliquer la procédure de détection, le fond de l'image a été éliminé par une simple opération de seuillage : les voxels dont le niveau de gris dépasse la valeur 220 ont été considérés comme faisant partie du fond.

Les *Fig.1 (c) et (d)* montrent les résultats d'étiquetage des noyaux. La valeur de sélection liée au test *Student* est fixée à 0.5, ce qui correspond à un niveau de signification supérieur ou égal à 95%. La valeur de T_0 est fixé à 155, ce qui suppose qu'il existe au moins 155 voxels de type contour entre deux noyaux. Cela correspond environ à 6% du volume moyen des noyaux qui est de $16 \times 16 \times 10$. Dans les *Fig.1 (c) et (d)*, chaque noyau étiqueté est marqué à l'aide d'un cube centré au barycentre des *germes* associés. On peut noter la possible déviation du barycentre calculé (à partir des *germes*) par rapport au centre réel du noyau; ceci est dû à la fois à l'asymétrie de la forme des noyaux et à la distribution non-homogène des *germes* détectés à l'intérieur des noyaux. Par ailleurs, on peut remarquer l'absence d'étiquetage "visible" de certains noyaux sur les *Fig.1 (c) et (d)*. Cette absence ne dévalorise absolument pas la qualité de l'étiquetage, mais est plutôt liée aux difficultés de présentation des résultats. Puisque nous ne cherchons pas à segmenter les noyaux, nous ne connaissons pas, à l'issue de l'étiquetage, la surface exacte des noyaux. Il est donc très difficile de mettre en évidence les noyaux correctement étiquetés au moyen de visualisations statiques. La construction d'images de synthèse exploitant l'opacité (voir *Fig.1 (e) et (f)*) donne des indications mais n'est pas suffisante même lors qu'on considère plusieurs points de vue dans la scène 3D. Nous réfléchissons maintenant à d'autres techniques de validation s'appuyant sur une analyse de la répartition spatiale des objets 3D ou sur une validation croisée avec les données fonctionnelles issues de différentes analyses (modèle biologique théorique, analyse de la répartition spatiale des facteurs de croissance, etc.). Certaines techniques de correction peuvent aussi être envisagées [5].

Notons enfin que le travail effectué constitue une étape importante pour l'objectif biologique poursuivi : l'analyse fonctionnelle de la glande colique au travers d'observations de marqueurs de certains récepteurs membranaires.

References

- [1] H. Ancin, B. Roysam, T. E. Dufresne, M. M. Chesnut, G. M. Rider, D. H. Szarowski, and J. N. Turner. Advances in automated 3d image analysis of cell populations imaged by confocal microscopy. *Cytometry*, 25:221–234, 1996.
- [2] M.J. Black and A. Rangarajan. On the unification of line processes, outlier rejection, and robust statistics with applications in early vision. *Inter. J. Comp. Vision.*, 19(1):57–91, July 1996.
- [3] G. Gong and B. Parvin. Model based segmentation of nuclei. In *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, volume 1, pages 256–261, 1999.
- [4] T. Kanungo, R. Haralick, H. S. Baird, W. Stuehle, and D. Madigan. A statistical nonparametric methodology for document degradation model validation. *Pattern Anal. Mach. Int.*, 22(11):1209–1223, November 2000.
- [5] J. Lund and M. Rudemo. Models for point processes observed with noise. *Biometrika*, 87(2):235–249, June 2000.
- [6] S. Masnou and J. M. Morel. Level lines based disocclusion. In *IEEE International Conference on Image Processing*, Chicago, USA, 1998.
- [7] C. Ortiz De Solórzano, E. Garcia Rodriguez, A. Jones, D. Pinkel, and J. W. Gray. Segmentation of confocal microscopy images of cell nuclei in thick tissue sections. *Journal of Microscopy*, 193:212–226, 2000.
- [8] J. Shen and S. Castan. Edge detection based on multi-edge models. In *Proceeding of SPIE'87*, Cannes, France, 1987.
- [9] P. J. Verveer, M. J. Gemkow, and T. M. Jovin. A comparison of image restoration approaches applied to three-dimensional confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 193(1):50–61, January 1999.
- [10] J. Wang. *Analyse et suivi de mouvements 3D articulés: application à l'étude du mouvement humain*. Ph.D thesis, Université de Rennes I, www.irisa.fr, 1992.
- [11] H.S. Wu, J. Barba, and J. Jil. Iterative thresholding for segmentation of cells from noisy images. *Journal of Microscopy*, 197(3):296–304, March 2000.

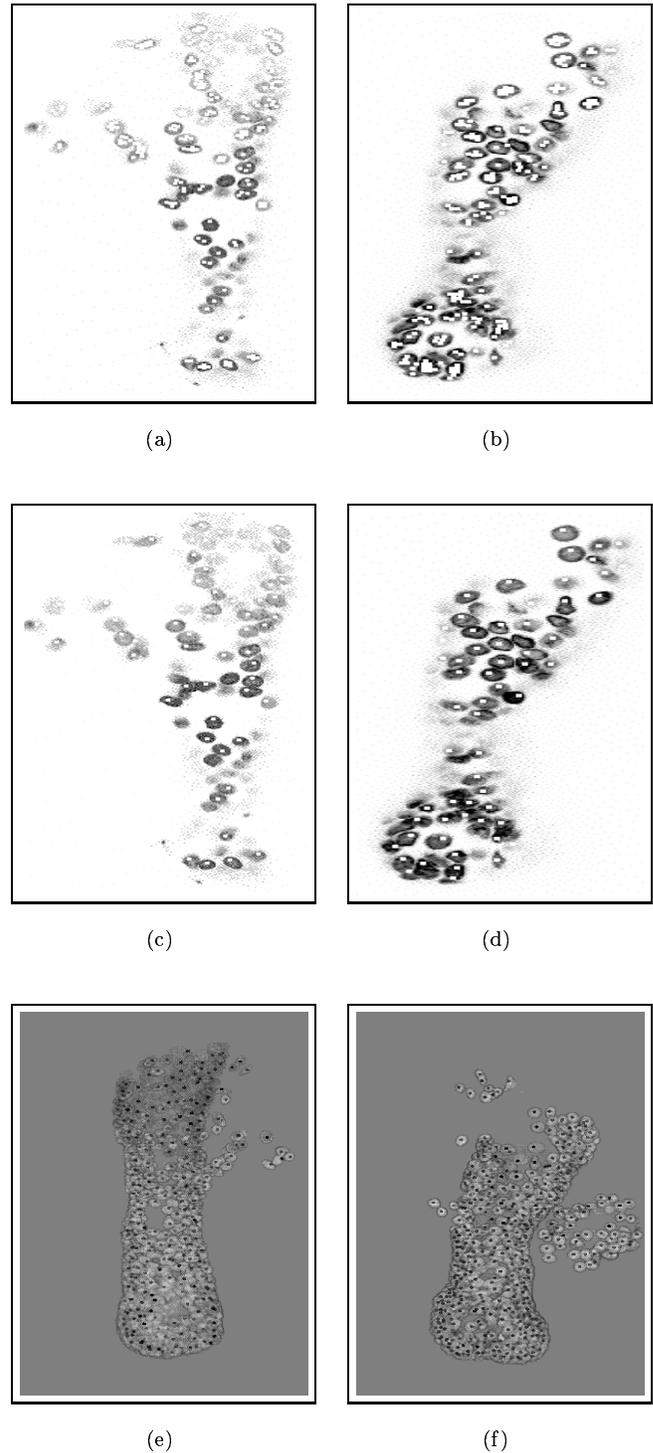


Figure 1. Résultats obtenus sur deux glandes coliques de rats différents. La colonne de gauche représente les résultats obtenus sur une glande colique et la colonne de droite ceux obtenus sur l'autre. (a) et (b) Germes détectés; (c) et (d) Noyaux étiquetés; (e) et (f) Rendu volumique des données et des noyaux étiquetés.