

Flux optique sous contrainte fluide pour l'estimation de grandeurs mécaniques en biologie cellulaire

Timothée LECOMTE¹, Roman THIBEAUX², Nancy GUILLEN², Alexandre DUFOUR¹ Jean-Christophe OLIVO-MARIN¹

¹Institut Pasteur, Unité d'Analyse d'Image Quantitative
25, rue du docteur Roux, 75015 Paris, France

²Institut Pasteur, Unité de Biologie Cellulaire du Parasitisme
25, rue du docteur Roux, 75015 Paris, France
timothee.lecomte@pasteur.fr

Résumé – Nous analysons des séquences de cellules en mouvement observée par microscopie de fluorescence, dans l'objectif d'évaluer les grandeurs physiques qui définissent le mouvement : les déplacements, les forces qui les produisent, ainsi que la pression qui décrit l'état du milieu. Pour cela, nous utilisons une méthode de flux optique contrainte par les équations de la mécanique des fluides, à savoir les équations de Stokes qui caractérisent un fluide homogène, incompressible, s'écoulant à faible nombre de Reynolds. Nous présentons une formulation de ce problème d'optimisation sous contrainte à l'aide d'éléments finis. Nous appliquons la méthode sur des données synthétiques et des séquences réelles, évaluant ainsi des grandeurs qui sont inaccessibles dans une expérience directe.

Abstract – We analyze sequences of moving cells as observed by fluorescence microscopy, in order to estimate the physical quantities that define the movement: the displacements, the forces that produce them, and the pressure that describes the state of the cellular medium. To reach that goal, we use an optical flow method that is constrained by flow mechanics equations, namely the Stokes equations of an homogeneous and incompressible fluid, flowing with a small Reynold number. We present a formulation of this constrained-optimisation problem based on a discretization with finite elements. We apply the method on synthetic data and on actual microscopy sequences, thus estimating quantities that are impossible to measure directly by an experiment.

Introduction

La motilité des cellules vivantes est un sujet de recherche très actif [1, 2]. Elle est un facteur déterminant dans beaucoup de processus biologiques. Elle intervient dans l'invasion parasitaire, en permettant aux parasites comme l'amibe *Entamoeba histolytica* de traverser parois et muqueuses et de pénétrer dans des organes vitaux. Des recherches récentes se focalisent sur la mécanique interne de la cellule en proposant que le mouvement est la conséquence d'une instabilité dynamique [3]. Vérifier expérimentalement ces hypothèses relève du défi. En effet, si les forces externes exercées par la cellule sur le milieu dans lequel elle se déplace peuvent être mesurées expérimentalement, En revanche la mesure expérimentale et dense de grandeurs mécaniques internes à la cellule n'a pas encore été réalisé. En parallèle des études expérimentales, des progrès importants ont été obtenus du côté de la modélisation en simulant une cellule avec l'ensemble de ses composants et leurs propriétés mécaniques [4]. Nous proposons donc d'utiliser le traitement d'images pour résoudre le problème inverse consistant à estimer les grandeurs mécaniques d'un modèle cellulaire à partir de séquences microscopiques où l'on observe le déplacement d'un parasite.

Les méthodes de flux optique permettent l'analyse cinématique de séquences temporelles et fournissent l'estimation de

champs de déplacement, ce qui est en soit un résultat précieux. Nous invitons le lecteur à consulter la référence [5] pour avoir un aperçu des travaux récents en flux optique variationnel. Notre objectif est d'unifier ce point de vue cinématique avec une analyse dynamique, dont le but est d'estimer des grandeurs mécaniques : les forces qui régissent le mouvement et la pression qui décrit l'état local du milieu cellulaire. Nous souhaitons donc estimer le champ de déplacement qui relie deux images, tout en opérant sur un nombre limité de variables de contrôle (forces et déplacements aux bords) : ce problème est une application de la théorie du contrôle optimal [6].

Ruhnau et Schnörr [7] ont mis au point une méthode similaire pour des applications en vélocimétrie de particules. Leur travail considère des forces localisées, comme la friction sur des parois, et l'objectif avancé est d'améliorer l'estimation du déplacement plutôt que d'évaluer des grandeurs nouvelles. Nous revisitons cette méthode avec des objectifs différents : nous souhaitons considérer des forces délocalisées, et nous sommes spécifiquement intéressés par les valeurs de forces et pression obtenues.

Dans la suite, nous présentons la méthode variationnelle du flux optique sous contrainte, sa discrétisation par éléments finis, et quelques résultats sur des données synthétiques et réelles.

1 Flux optique sous contrainte fluide

Le flux optique a pour but de trouver le champ de déplacement \vec{u} qui fait correspondre deux images I_1 et I_2 de sorte que :

$$I_2(\vec{x} - \vec{u}) = I_1(\vec{x}) \quad (1)$$

Si le déplacement est assez petit, cette équation peut être linéarisée :

$$\vec{\nabla} I_2 \cdot \vec{u} + (I_1 - I_2) = 0 \quad (2)$$

Pour trouver \vec{u} , l'idée habituelle en flux optique variationnel est de minimiser une fonctionnelle objectif dont le premier terme est :

$$J_u = \frac{1}{2} \iint_{\Omega} d\Omega (\vec{\nabla} I_2 \cdot \vec{u} + (I_1 - I_2))^2 \quad (3)$$

Ω désigne le domaine image. Notons que l'imagerie en microscopie de fluorescence considérée dans cette communication ne souffre pas de problèmes d'occlusion comme les séquences vidéo habituellement analysées par le flux optique. Pour cette raison, une norme L_2 est satisfaisante pour le terme d'attache aux données J_u .

J_u ne définit pas complètement \vec{u} , il ne définit qu'une direction qui lui est orthogonale. \vec{u} est donc d'habitude régularisé pour que la solution soit unique. Ici, nous supposons plutôt que \vec{u} est solution de l'équation de Stokes, qui est un cas particulier de l'équation de Navier-Stokes de la mécanique des fluides, dans la limite d'un nombre de Reynolds petit et pour un fluide homogène incompressible :

$$-\mu \Delta \vec{u} + \vec{\nabla} p = \vec{f} \quad \text{dans } \Omega \quad (4a)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{u} = 0 \quad \text{dans } \Omega \quad (4b)$$

$$\vec{u} = \vec{g} \quad \text{sur } \Gamma \quad (4c)$$

Γ désigne le bord du domaine image. \vec{f} , p , et \vec{g} sont respectivement les forces qui s'exercent sur le fluide, la pression et les déplacements aux bords. Nous supposons de plus que la viscosité μ est constante, de sorte qu'elle peut être intégrée dans p et f . Ce modèle est une approximation très simple du milieu cellulaire, qui est en réalité plus complexe [4] (viscosité variable, élasticité, caractère multi-phases, etc.). Néanmoins, intégrer des détails supplémentaires dépasse le cadre de ce travail, où nous considérons que le système de Stokes (4) est un bon choix en première approximation. Par ailleurs, bien que le modèle général soit tridimensionnel, nous choisissons de restreindre les déplacements au plan de l'image, ce qui est satisfaisant pour l'analyse d'expériences où les cellules se déplacent sur un substrat planaire.

Les *contrôles* dans l'équation 4, c'est-à-dire le champ de forces \vec{f} et les déplacements aux bords \vec{g} , sont régularisés. Les termes suivants s'ajoutent à la fonctionnelle objectif pour pénaliser l'amplitude et les variations de \vec{f} et les variations de \vec{g} :

$$J_f = \frac{\alpha}{2} \iint_{\Omega} d\Omega \|\vec{f}\|^2 + \frac{\beta}{2} \iint_{\Omega} d\Omega \left(\|\vec{\nabla} f_1\|^2 + \|\vec{\nabla} f_2\|^2 \right) \quad (5)$$

$$J_g = \frac{\gamma}{2} \oint_{\Gamma} d\Gamma \|\nabla_{\Gamma} \vec{g}\|^2 \quad (6)$$

Après régularisation, le problème est bien posé. Il consiste à chercher un minimum de $J = J_u + J_f + J_g$, sous contrainte de vérifier le système d'équations de Stokes (4).

La résolution numérique de l'équation de Stokes (4) est bien maîtrisée dans le cadre des éléments finis [8]. Nous approximations les grandeurs par des fonctions polynomiales par morceaux sur la grille rectangulaire des pixels de l'image. Pour garantir la convergence de la discrétisation, nous choisissons les éléments de Taylor-Hood Q2-P1, respectivement quadratiques et linéaires pour les déplacements et la pression. Avec ce choix, la discrétisation de l'équation de Stokes produit des solutions numériquement stables. La différence d'intensités $I_2 - I_1$ et la dérivée spatiale $\vec{\nabla} I_2$ sont supposées constantes sur chaque élément. Les dérivées sont calculées avec une fenêtre centrée de 3 points, et les intensités des pixels sortant du domaine sont répliquées depuis le pixel valide le plus proche. L'énergie discrétisée est alors exprimée à l'aide de matrices :

$$J = \frac{1}{2} u^T G_u u + b_u^T u + \frac{1}{2} f^T G_f f + \frac{1}{2} g^T G_g g \quad (7)$$

Le système de Stokes (4) est discrétisé sur la base des éléments finis, si bien que chaque opérateur du système est assemblé en une matrice. Les variables discrètes g , u_{Ω_0} (déplacements à l'intérieur du domaine), p et f sont rassemblées en un unique vecteur d'inconnues $x = (g, u_{\Omega_0}, p, f)$ de sorte que le système de Stokes s'écrit $Ax = b$. Finalement, le problème de flux optique se formule comme la minimisation de $\frac{1}{2} x^T G x + c^T x$ sous la contrainte $Ax = b$, qui est un problème de *programmation quadratique*. Il peut être transformé en un problème non contraint à l'aide de multiplicateurs de Lagrange. La solution est alors obtenue avec les stratégies habituelles de résolution de systèmes linéaires creux, soit à l'aide d'un solveur direct (décomposition LU par exemple) si le système est suffisamment petit, soit à l'aide d'un solveur itératif (méthode des résidus minimaux par exemple).

Dans le cas où les déplacements sont grands, l'équation 2 n'est pas vérifiée. Cette difficulté est contournée en intégrant la méthode dans un schéma multi-échelle. Une pyramide d'images filtrées produite à partir des images de départ est parcourue de l'échelle la plus grossière vers la plus fine. A chaque échelle, l'image I_2 est préalablement recalée en utilisant les déplacements \vec{u} obtenues à l'échelle précédente. De cette façon, à chaque échelle l'équation 2, où I_2 est l'image recalée, est alors valide.

2 Résultats

Nous testons d'abord la méthode sur des données synthétiques, dont la vérité-terrain est connue. Nous choisissons un champ de forces (Fig. 2 c) et des déplacements aux bords. Nous résolvons le système de Stokes avec ces contrôles et obtenons un champ de déplacements (Fig. 2 a). Ensuite ce champ permet de transformer spatialement une image de référence. La séquence de test est composée de l'image originale et de l'image transformée (Fig. 1). On simule ainsi un fluide s'écoulant dans un domaine carré. Nous présentons ici une configuration de

contrôles dans laquelle les déplacements aux bords forcent un mouvement global du bord supérieur vers le bord droit, et une force qui tend à mettre le fluide en rotation. Les résultats (Fig. 2 d, e et f) montrent qualitativement que nous sommes capables d'estimer de manière satisfaisante les déplacements, la pression et les forces à partir de la séquence de test. L'évaluation de la performance et de la robustesse de la méthode sort du cadre de cette communication.

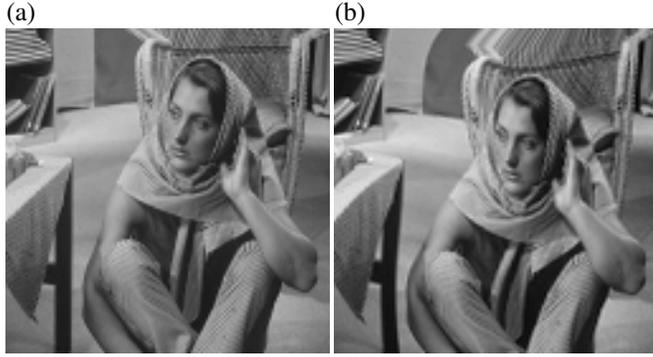


FIGURE 1 – Paire d'images utilisées pour tester l'algorithme. (a) Image originale. (b) Image transformée à partir du déplacement de la figure 2 (a).

Nous appliquons ensuite la méthode sur des séquences de microscopie confocale où sont observées des amibes en mouvement (Fig. 3) dont le cytosquelette a été identifié par un marqueur fluorescent. L'algorithme optimise la combinaison de forces et de déplacements aux bords qui reproduit le mieux le mouvement des structures, compte-tenu de la régularisation choisie. On obtient les champs de déplacement, la pression et les champs de force reproduits sur la figure 4. L'algorithme trouve un déplacement global dans la cellule de la droite vers le coin inférieur gauche, avec un mouvement plus petit vers le haut de la cellule. Le gradient de pression suit une diagonale principale. Le champ de force a une importante composante à l'intérieur de la cellule mais est essentiellement petit sur les bords de la cellule. Nous notons que le champ de déplacement est plus régulier que le champ de force, ce qui est conséquence de la contrainte fluide (4) qui relie le champ de force avec la dérivée seconde du champ de déplacement. À cause de la régularisation, l'algorithme trouve également des forces et des déplacements à l'extérieur de la cellule. Des travaux ultérieurs concernent la restriction des forces à l'intérieur de la cellule.

Conclusion

Nous avons présenté une méthode combinant le flux optique variationnel avec une contrainte fluide pour analyser des séquences de cellules en mouvement observée par microscopie de fluorescence. Nous modélisons le comportement du matériel cellulaire par les équations de Stokes de la mécanique des fluides. Le problème numérique d'optimisation sous contrainte nous a permis d'évaluer le déplacement, les forces et la pres-

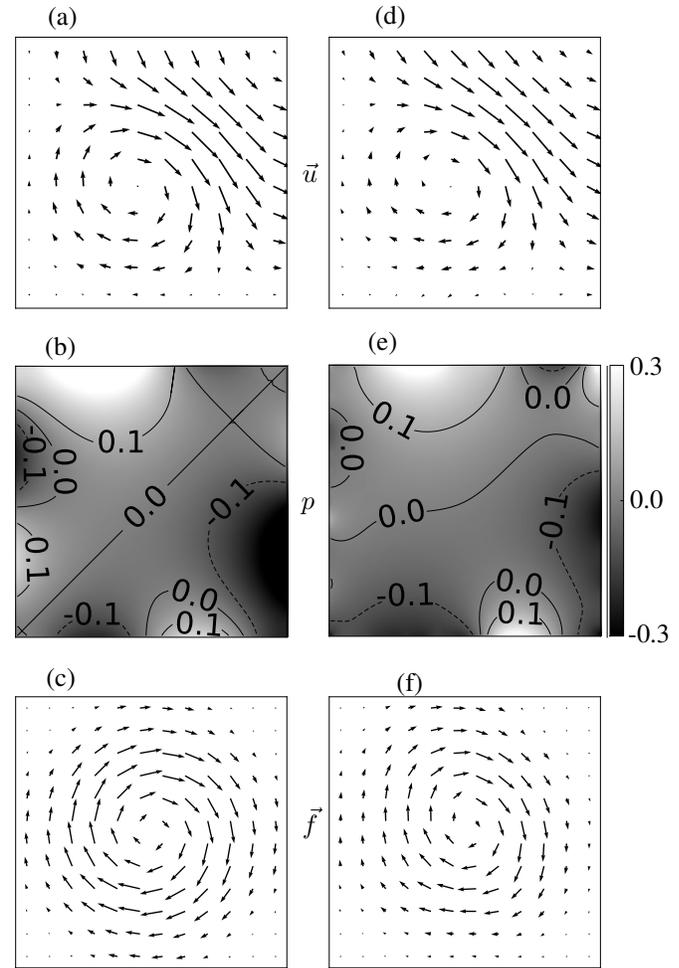


FIGURE 2 – Déplacements, pression et force. (a, b, c) Vérité terrain. (d, e, f) Grandeurs estimées avec $\alpha = 37$, $\beta = 3 \times 10^{-2}$ et $\gamma = 1.2 \times 10^3$.

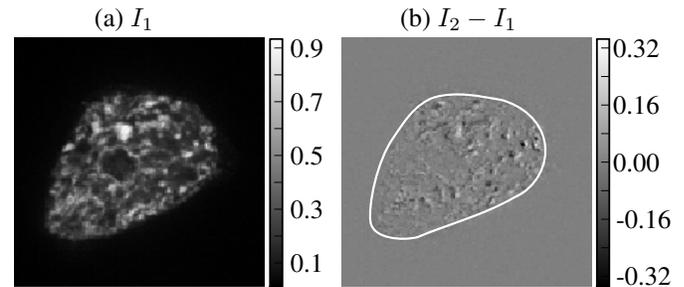


FIGURE 3 – (a) Première image d'une séquence d'amibe en mouvement observée par microscopie de fluorescence. (b) Différence entre les deux premières images. La ligne continue indique le bord de la cellule.

sion dans le domaine de l'image. Bien que les équations de Stokes soient une approximation très simple du milieu cellulaire, cette méthode constitue un moyen intéressant d'estimer

des grandeurs physiques internes à la cellule dont la mesure expérimentale reste encore un défi. Nos travaux futurs se concentreront sur l'intégration d'un modèle cellulaire plus complet et à l'application de la méthode à des données tridimensionnelles.

Références

- [1] D. Pantaloni, C. Le Clainche, and M.-F. Carlier. Mechanism of actin-based motility. *Science*, 292(5521) :1502–1506, 2001.
- [2] G. T. Charras, J. C. Yarrow, M. A. Horton, L. Mahadevan, and T. J. Mitchison. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*, 435(7040) :365–369, May 2005.
- [3] B. Maugis, J. Bruges, P. Nassoy, N. Guillen, P. Sens, and F. Amblard. Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility. *J Cell Sci*, 123(22) :3884–3892, November 2010.
- [4] R. H. Holmes and L. Edelstein-Keshet. A comparison of computational models for eukaryotic cell shape and motility. *PLoS Comput Biol*, 8(12) :e1002793, 2012.
- [5] H. Zimmer, A. Bruhn, and J. Weickert. Optic flow in harmony. *International Journal of Computer Vision*, 93 :368–388, 2011.
- [6] M.D. Gunzburger. *Perspectives in flow control and optimization*. Advances in design and control. SIAM, 2003.
- [7] P. Ruhnau and C. Schnörr. Optical stokes flow estimation : an imaging-based control approach. *Experiments in Fluids*, 42 :61–78, 2007.
- [8] V. Girault and P.A. Raviart. *Finite element methods for Navier-Stokes equations : theory and algorithms*. Springer series in computational mathematics. Springer-Verlag, 1986.

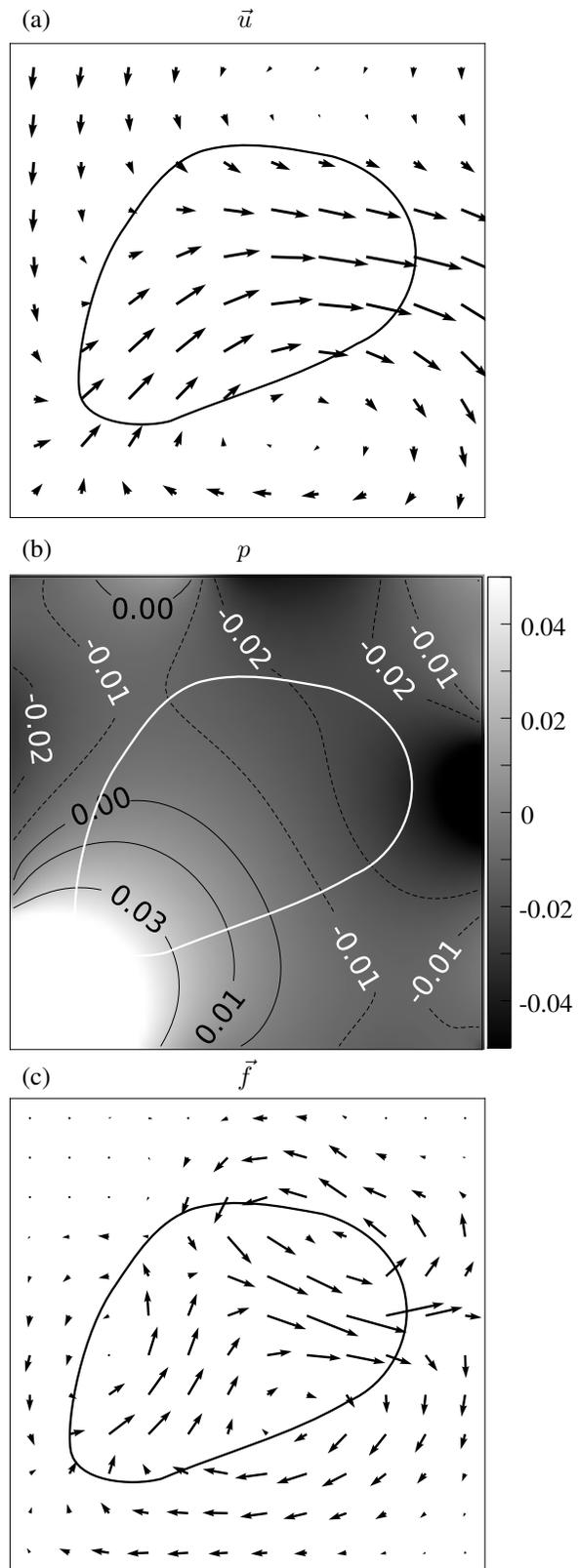


FIGURE 4 – (a) Déplacements, (b) pression et (c) force estimés avec $\alpha = 37$, $\beta = 3 \times 10^{-2}$ et $\gamma = 1.2 \times 10^3$. La ligne continue indique le bord de la cellule.