

Analyse en échelles de colonies de bactéries par imagerie incohérente et cohérente

Valentin GENUER^{1,3}, David ROUSSEAU², Éric LACOT², Emmanuelle SCHULTZ³

¹CEA, LETI, Département des microtechnologies pour la biologie et la santé,
MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France

²Université de Lyon, Laboratoire CREATIS; CNRS, UMR5220; INSERM, U1206,
Université Lyon 1; INSA-Lyon, Villeurbanne, France

³Université Grenoble-alpes, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique,
F-38402 Saint-Martin-d'Hères, France

valentin.genuer@cea.fr, david.rousseau@univ-lyon1.fr
eric.lacot@univ-grenoble-alpes.fr, emmanuelle.schultz@cea.fr

Résumé – L'analyse multiéchelles des fréquences spatiales est un outil de caractérisation classique en analyse d'images. Lorsque l'on applique cet outil aux images naturelles prises aux échelles macroscopiques acquises en éclairage incohérent, il est connu que la diversité de formes et d'échelles se traduisent par une invariance à travers les échelles. Nous appliquons cet outil d'analyse d'images aux échelles microscopiques pour caractériser des images de colonies de bactéries acquises en éclairage incohérent et en éclairage cohérent (via un laser). Nous discutons l'apport de l'éclairage cohérent sur des images réelles et de synthèse.

Abstract – Multiscale analysis in the spatial frequency domain is a classical tool in image processing. When applied to images of natural scenes of the macroscopic world, classically acquired with an incoherent lighting, it is known that the diversity of shapes and scales translates into a scale invariance. We apply these image analysis tools at the microscopic scales to characterize groups of bacteria acquired in incoherent light and coherent light (with a laser). We discuss the interest that coherent light brings to real images and synthetic images.

Une approche classique pour caractériser le contenu des fréquences spatiales d'une images $I(x; y)$ consiste à calculer $F(I(x; y))$, sa transformée de Fourier, suivi du spectre de puissance $P(f) = |F(I(x; y))|^2$, que l'on moyenne en coordonnées polaires selon toutes les directions angulaires

$$DSP(f) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} P(f) \exp(j\theta) d\theta. \quad (1)$$

Une signature usuelle de cette analyse lorsqu'elle est appliquée dans des scènes naturelles aux échelles macroscopiques consiste en des évolutions invariantes en échelles, sous formes de lois de puissances du spectre de puissances des images de luminances [1, 2, 3, 4]. De telles évolutions peuvent être identifiées sur un tracé en échelles log-log quand le spectre de puissance moyenné suit une droite selon une gamme d'échelles spatiales étendues. Ceci correspond à une densité de puissance $DSP(f)$ gouvernée par une pente constante à travers les échelles spatiales. Cette autosimilarité en échelle, synonyme de fractale, a été observée dans différentes conditions comme dans l'espace colorimétrique avec d'autres métriques basées sur l'histogramme 3D couleur [5] ou encore dans les images de profondeur [3]. Plus récemment, ce type d'analyse a été appliqué aux échelles microscopiques [4] sur des scènes complexes de type histologie qui montraient le même type de signature en

loi de puissance. Le caractère apparemment universel de ce comportement empirique peut se comprendre dans le cas de scènes complexes, nativement composées de multiples objets comme c'est le cas dans la nature aux échelles microscopiques ou macroscopiques. Ceci n'est en rien évident puisque, chaque objet qui constitue ces scènes pris individuellement produit un spectre de puissance qui n'est pas forcément invariant en échelle comme par exemple un disque dont le spectre de puissance est gouverné par les oscillations d'une fonction de Bessel de première espèce. Ainsi, un régime intéressant à observer est la façon dont ce régime de loi de puissance s'établit à mesure qu'une scène s'enrichit avec de nouveaux objets. Il s'agit d'une situation que l'on peut rencontrer dans la nature lorsque l'on observe des organismes vivant en croissance comme récemment montré pour les plantes [1]. Nous poursuivons ce type d'analyse dans cette communication en nous focalisant sur des images aux échelles microscopiques via le suivi de colonies de bactéries en développement. Nous testons dans cette perspective deux type d'éclairages l'un incohérent, produisant une image de luminance classique, et l'autre cohérent, au moyen d'un laser, dont nous discutons l'effet et l'apport dans le spectre des fréquences spatiales.

1 Images expérimentales

Sur milieu de culture solide, typiquement une boîte de Pétri, les cellules bactériennes ont tendance à grandir en formant des colonies, c'est à dire un amas de cellules issues de la même cellule mère. Le dispositif expérimental mis en oeuvre pour le suivi de la croissance de colonies bactériennes est le dispositif Microdiff utilisé habituellement pour l'identification de pathogènes [6, 7]. Comme illustré dans la Fig. 1, une boîte de Pétri est placée sur le trajet d'un faisceau laser de sorte que l'image de diffraction générée par l'interaction entre le laser et une colonie bactérienne soit enregistrée par un capteur CCD. Pour comparaison, un deuxième éclairage a été testé : un éclairage incohérent pour l'acquisition d'une image de type microscope.

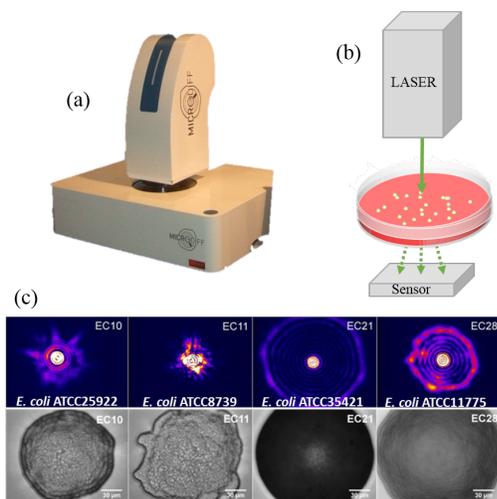


FIGURE 1: Photo (a) et schéma (b) du dispositif Microdiff pour l'identification rapide et sans marquage de microorganismes pathogènes directement sur leur milieu de culture. En (c) quatre comparaisons entre images incohérentes au microscope (ligne du bas) et images cohérentes de diffraction en transmission (ligne du haut) sur des microcolonies de quatre souches différentes d'*Escherichia coli*.

Des exemples d'images acquises sont montrés sur la Fig. 2, où la transformée de Fourier numérique de l'image acquise en éclairage incohérent est calculée pour comparaison avec le spectre directement acquis tout optiquement en éclairage cohérent. L'imagerie cohérente semble ainsi contenir plus d'informations que la vue microscope en lumière incohérente. Ceci est tout à fait logique dans la mesure où la modulation de phase induite par la colonie bactérienne se traduit par des variations d'intensités au travers des différentes oscillations.

2 Images de synthèse

Expérimentalement, il est délicat d'acquérir l'apparition des toutes premières bactéries dans le milieu de culture. Pour explorer ce qui se produit dans cette phase du processus de répli-

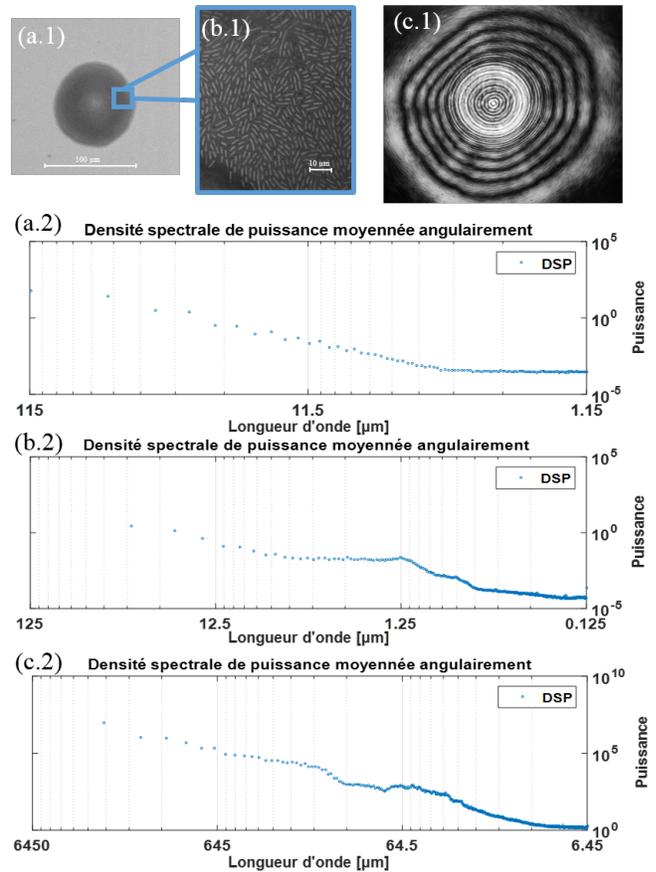


FIGURE 2: Puissance $DSP(f)$ d'images acquises en éclairage incohérent et cohérent.

(a.1) image microscope d'une colonie d' *E. coli* (ATCC 11775) après 6h de croissance sur milieu de culture TSA en incubateur (37°C), (a.2) son spectre de puissance moyenné angulairement. (b.1) un zoom sur une partie de la colonie afin de s'affranchir des bords et d'obtenir une résolution cellulaire; sa DSP moyennée angulairement en (b.2). (c.1) image de diffraction sur la colonie entière acquise en transmission à travers le milieu de culture, (c.2) moyenne angulaire de sa DSP.

cation, nous avons simulé numériquement des colonies en croissance en répliquant des masques de bactéries. Latéralement, le baricentre de ces masques est tiré selon un bruit uniforme spatialement blanc en autorisant des recouvrements, qui simulent la croissance multicouches des bactéries en 3D. Le nombre de cellules est augmenté au fur et à mesure. La forme des cellules bactériennes a été extraite à partir d'images microscopes de bacilles, c'est à dire des cylindres de $1.5 \mu m$ de diamètre pour une longueur d'environ $7 \mu m$. Nous pouvons ainsi simuler les images acquises en éclairage cohérent et incohérent comme visible sur la Fig. 3. Les cellules ont un indice de réfraction de 1.38 et baignent dans une matrice extracellulaire d'indice 1.35 [7]. Le champ diffracté est calculé par intégration numérique de l'intégrale de Rayleigh-Sommerfeld utilisant la transformée de Fourier[8]. L'équation (2) donne l'expression du champ diffracté. O désigne la colonie bactérienne et f le noyau de convo-

lution (non détaillé dans cet article). On définit les systèmes de coordonnées de la colonie bactérienne et du plan image comme X, Y, x et y respectivement

$$E(x, y, z) \propto (f \star g)(x, y) = \iint_{\mathcal{O}} f(x - X, y - Y) \cdots \times g(X, Y) dX dY. \quad (2)$$

L'équation (3) donne la modulation induite par la colonie bactérienne séparée en deux termes comme suit : un terme de transmission T cartographiant la densité optique de la colonie et un terme de phase Φ défini dans l'équation (4) combinant le profil altimétrique H de la colonie avec sa cartographie d'indice de réfraction (H_0 est la hauteur maximale de la colonie et n_{colony} et n_{air} les indices de réfraction de la colonie et de l'air respectivement)

$$g(X, Y) = T(X, Y) \times E_{inc}(X, Y; z_{\mathcal{O}}) \times e^{ik\Phi(X, Y)} \quad (3)$$

$$\Phi(X, Y) = n_{colony}(X, Y) \times H(X, Y) + n_{air} [H_0 - H(X, Y)] \quad (4)$$

Nous avons ensuite produit les mêmes analyses que pour les images expérimentales de la section précédente. Nous observons la croissance bactérienne de deux façons : dans son ensemble avec un champ de vue incorporant la totalité de la colonie Fig. 1 et en zoomant sur une sous-partie de la colonie pour s'affranchir de ses bords et mieux résoudre la dynamique locale du processus de réplication. Avec le champ de vue large, l'analyse spectrale en éclairage cohérent ou incohérent comme montré dans la Fig. 4 est essentiellement sensible à la forme globale de la colonie dont on peut estimer la taille à partir de la fréquence de coupure du spectre. Globalement, en passant d'une bactérie à 10000 on observe que l'on évolue du spectre intégré d'une seule bactérie à celui d'une fonction de Bessel, signature d'un disque. Le spectre intégré en lumière cohérente évolue de façon plus chahutée mais suit la même allure globale qu'en lumière incohérente.

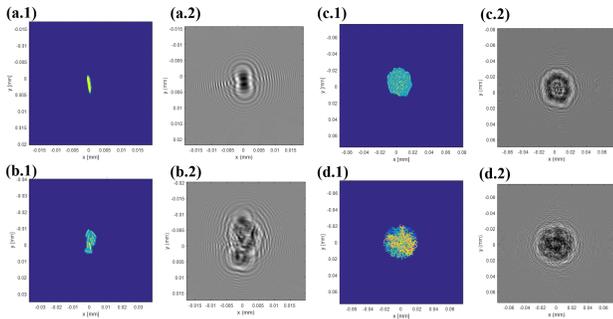


FIGURE 3: (a.1, b.1, c.1, d.1) cartes de transmission optique pour des colonies simulées de 1, 10, 100 et 10000 cellules respectivement. (a.2, b.2, c.2, d.2) les champs diffractés calculés correspondants.

Le champ de vue plus resserré permet d'annuler l'effet des bords de la colonie dans le spectre. La croissance bactérienne

correspond à une réplication de motifs. Dans un premier temps, la réplication aléatoire du motif se fait dans un plan. Une translation-rotation d'un motif dans un plan, après intégration de la DSP dans toutes les directions, va se traduire par un seul effet sur la phase de la transformée de Fourier. Lorsque les bactéries s'accumulent sur plus d'un plan avec des recouvrements, le processus s'apparente à celui du modèle dit de feuilles mortes. Ce modèle décrit le régime limite produit lorsqu'un grand nombre de motifs a été généré. Le cas de motifs semi-transparents amassés a été introduit dans [9]. Les modèles de feuilles mortes se traduisent par une signature dans le spectre intégré dans toutes les directions de type loi de puissance lorsque qu'un grand nombre de motifs est amassé. Nous avons simulé des bactéries avec trois niveaux de transparence $T = 0, 0.5$ et 0.95 (0 : opaque, 1 : transparent). Nous observons sur la Fig. 5 la façon dont ce régime est atteint lorsque l'on passe de 100 à 10000 bactéries en éclairage incohérent. Les coefficients de corrélation proches de 1 des régressions linéaires en échelle log-log traduisent l'instauration de lois de puissance comme prédit dans le modèle des feuilles mortes. En éclairage cohérent, comme le montre la Fig. 6, cette évolution vers une loi de puissance n'est pas observée, à mesure que l'on fait croître le nombre de bactéries en les observant via un zoom. La colonie devient un milieu de plus en plus chahuté à l'échelle de la longueur d'onde ce qui perturbe la surface d'onde qui traverse le milieu et produit de façon rapprochée des interférences constructives (grain intense) et destructives (grain sombre). L'augmentation de la taille de la colonie de bactéries se traduit donc par des modulations des motifs de speckle avec un grain moyen de plus en plus petit ce qui donne une signature spectrale qui correspond à celle d'un bruit blanc filtré passe-bas dont la fréquence de coupure évolue en augmentant avec le nombre de bactéries. Ce biomarqueur est plus sensible en imagerie cohérente qu'en imagerie incohérente où la mesure d'une loi de puissance, si elle est intéressante sur un plan conceptuel, est moins sensible (pente comprise entre 1 et 2).

3 Conclusion

Le processus de croissance d'une colonie bactérienne a été analysé expérimentalement au moyen d'un éclairage cohérent et incohérent. Sur un plan applicatif, ceci montre que la croissance globale de la colonie peut être suivie sans avoir besoin d'une imagerie directe via l'analyse du champ de diffraction qui correspond à la transformée de Fourier optique (lorsque celui-ci est enregistré dans le plan focal d'un système imageur). En mode "zoom", la situation est également intéressante puisqu'elle constitue, en éclairage incohérent, une instance pratique d'un modèle théorique de feuille mortes transparentes récemment introduit sur des images de synthèse. De manière plus générale, l'analyse en fréquence des images de diffraction couplées aux images en illumination incohérente apporte un nouveau regard sur la technique d'identification de pathogènes par diffusion élastique optique Microdiff puisqu'elle permettra

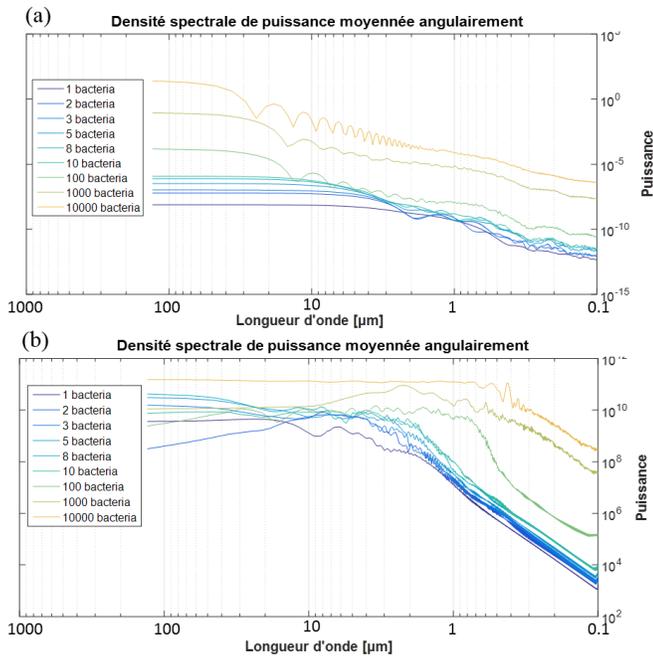


FIGURE 4: En (a) les densités spectrales de puissance moyennées angulairement des colonies simulées, éclairage incohérent. En (b) celles des champs diffractés en éclairage cohérent.

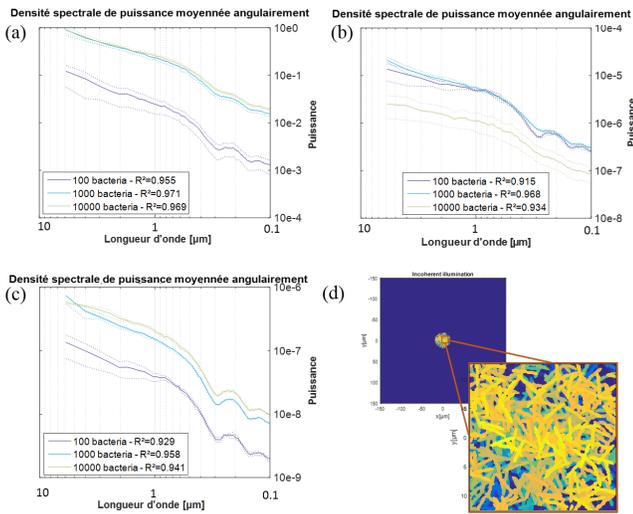


FIGURE 5: DSP de l'intérieur de colonies simulées. (a,b,c) correspondent aux trois niveaux de transparence 0, 0.5 et 0.95. En (d) un exemple d'intérieur de colonie simulée. Les DSP présentées sont les moyennes sur 10 réalisations. Les lignes pointillées illustrent les déviations standards. Les R^2 indiqués en légende sont les moyennes des coefficients de corrélation des régressions linéaires calculées sur les différentes réalisations.

de mettre en évidence la traduction de la signature biophysique des microorganismes via l'imagerie cohérente auparavant inac-

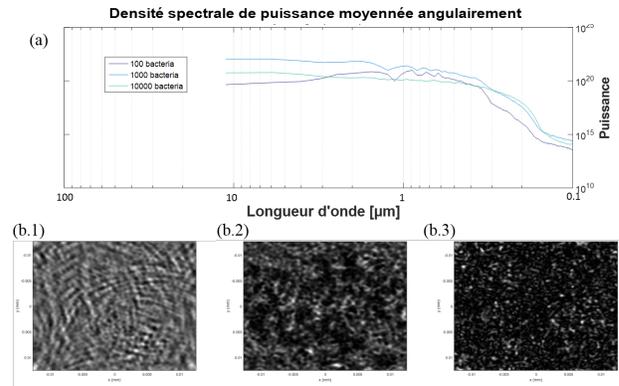


FIGURE 6: En (a) DSP de champs diffractés à partir d'intérieur de colonies simulées. (b.1,2,3) respectivement les champs diffractés de colonies composées de 100, 1000 et 10000 bactéries.

cessible en simple imagerie incohérente.

Références

- [1] H. J. Zedde *et al.*, Counting leaves without "finger-counting" by supervised multiscale frequency analysis of depth images from top view. *British Machine Vision Conference*. Nottingham, 2015.
- [2] D. L. Ruderman *et al.*, Statistics of natural images : Scaling in the woods. *Physical review letters*. vol. 73, pp. 814–817, 1994.
- [3] Y. Chéné *et al.*, Multiscale analysis of depth images from natural scenes : Scaling in the depth of the woods. *Chaos, Solitons & Fractals*. vol. 54, pp. 135–149, 2013.
- [4] H. Rositi *et al.*, Analyse en échelles pour l'optimisation du paramètre de reconstruction en tomographie X de phase application à l'imagerie du cerveau du petit animal. *In XXV e GRETSI, Lyon, France*. pp. 1–4, 2015.
- [5] J. Chauveau *et al.*, Fractal capacity dimension of three-dimensional histogram from color images. *Multidimensional Systems and Signal Processing*. vol. 21, pp. 197–211, 2010.
- [6] P. R. Marcoux *et al.*, Optical forward-scattering for identification of bacteria within microcolonies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2014) 98 : 2243-2254.
- [7] V. Genuer *et al.*, Optical elastic scattering for early label-free identification of clinical pathogens, *Proc. SPIE 969808, Advanced Biomedical and*
- [8] F. Shen *et al.*, Fast-Fourier-transform based numerical integration method for the Rayleigh-Sommerfeld diffraction formula, *Appl. Opt.*, Vol. 45, No. 6, (February 20, 2006).
- [9] B. Galerne *et al.*, The Transparent Dead Leaves Model. *Advances in Applied Probability, Applied Probability Trust*, 2012, 44 (1), pp.1-20.