

Analyse et visualisation de l'évolution de cellules vivantes dans une image 4D

Aassif Benassarou - Eric Bittar - Laurent Lucas

LERI EA2618 - MADS
Rue des Crayères
BP 1035
51687 Reims CEDEX 2
aassif.benassarou@univ-reims.fr

Résumé : *Dans cet article, nous présentons une méthode complète pour visualiser et quantifier les phénomènes biologiques se déroulant dans une série temporelle d'images 3D, c'est-à-dire une image 4D. Nous décrivons notamment comment nous avons étendu l'utilisation d'un modèle déformable surfacique, le δ -snake, pour résoudre les difficultés rencontrées dans ce domaine. Cette méthode est illustrée par des résultats expérimentaux sur des données réelles obtenues par microscopie confocale.*

Mots-clés : imagerie biomédicale, visualisation 4D, modèles déformables, simulation.

1 Introduction

L'un des enjeux de cette recherche consiste à suivre directement dans les cellules vivantes les phénomènes biologiques qui s'y déroulent afin de mieux en appréhender les effets et de comprendre leur portée globale à l'échelle de la cellule. Cette approche s'applique en particulier à l'étude des effets moléculaires et cellulaires des agents anticancéreux, dans le but d'établir des facteurs prédictifs de la réponse des cellules cancéreuses à ces molécules. Il est en effet essentiel de parvenir à une meilleure compréhension de la prolifération des cellules cancéreuses, de sa modulation par certains agents anticancéreux et des modifications moléculaires et cellulaires induites par ces traitements. Ceci requiert le décryptage précis de l'organisation moléculaire, structurale et fonctionnelle du noyau cellulaire, notamment dans des cellules vivantes. Le nucléole représente un domaine de choix pour ces analyses car il est l'expression morphologique de la synthèse et de la maturation des ARN ribosomiques (ARNr), qui sont des composants majeurs de la machinerie de synthèse des protéines. En effet, le nombre et la surface des nucléoles, ainsi que la présence de certaines protéines, constituent d'importants paramètres indicateurs de la prolifération cellulaire. L'étude des protéines nucléolaires peut donc permettre de révéler des indices très précoces de la prolifération ou au contraire de son inhibition.

Le projet de recherche auquel les développements de cet article sont appliqués, consiste en l'étude de l'organisation volumique et fonctionnelle du nucléole des cellules cancéreuses et de ses modifications sous l'action de médicaments anticancéreux. Notre but est de parvenir à une véritable modélisation du comportement spatio-temporel du nucléole en fonction de la prolifération et de la sensibilité aux médicaments de la famille des camptothécines. Cette étude nécessite une approche pluridisciplinaire mettant en œuvre des techniques innovantes de biologie moléculaire (expression de protéines chimères associées à la GFP¹), de microscopie (microscopie confocale au cours du temps et vidéo-microscopie) et bien entendu d'informatique graphique.

Parce qu'elles correspondent aux dimensions de ce que représente physiquement la réalité, au contraire des images 2D ou 3D qui n'en sont que de simples projections (fixation du temps), les images 4D (séries d'images 3D + t) permettent d'analyser quantitativement les mouvements et déformations du monde tridimensionnel au cours du temps pour en comprendre les causes sous-jacentes et tenter d'en fournir des modèles prédictifs.

Définies à partir d'enregistrements tels que chaque point est identifié par un 4-uplet $\{x, y, z, t\}$, ces séries de volumes peuvent être obtenues à partir de simulations numériques comme être

¹Green Fluorescent Protein

acquises à partir d'appareils prévus à cet effet. Des exemples typiques de ce type de données variant au cours du temps concernent la simulation CFD (pour « Computational Fluid Dynamics »), ou comme dans notre cas en biologie, le sondage de modèles cellulaires par l'étude de la localisation des différentes structures en relation avec leur dynamique (leur fonction), à partir de cellules vivantes marquées par des protéines chimériques. Le principal problème résultant des observations du continuum espace/temps concerne l'énorme quantité de données à traiter. En effet, au lieu de manipuler un unique volume de 256^3 voxels ou plus, on est très vite confronté à la gestion de quelques dizaines, voire centaines, de volumes selon le nombre de pas de temps considérés.

Si une première approche consiste à traiter indépendamment chaque volume 3D de la séquence pour produire des animations par exemple, elle reste totalement inefficace pour analyser et interpréter correctement toute l'information contenue dans la série. En effet, elle ne fournit pas d'informations analytiques sur l'évolution des déformations de régions de l'espace, sur leur durée de vie, leurs volumes ou tout autre descripteur morphométrique ou statistique. De même, elle ne permet pas aux utilisateurs de caractériser les principaux événements marquant le processus d'évolution.

Cet article s'organise donc de la manière suivante. Après un bref état de l'art, nous présenterons notre système en précisant comment nous avons étendu un modèle déformable pour réaliser le suivi temporel d'objets 3D. Nous présenterons et discuterons ensuite quelques uns de nos résultats avant de conclure et de donner quelques éléments prospectifs.

2 Etat de l'art

L'étude de phénomènes dynamiques acquis au moyen de séries temporelles d'images 3D peut s'effectuer de maintes façons au regard du domaine d'application considéré. Le suivi de primitives (ou « feature tracking ») se présente comme l'une des nombreuses solutions à apporter à ce type d'exercice. D. SILVER et X. WANG [SW96, SW98] proposent un algorithme permettant à partir d'une série temporelle d'images 3D de suivre un ensemble de propriétés préalablement sélectionnées et d'en visualiser les évolutions. Le principe retenu ici consiste à appareiller hiérarchiquement, selon un octree, des régions de l'espace qui se recouvrent. Plus récemment, E. BITTAR *et al* [BLP99] ont abordé ce problème en terme d'appariement de graphes caractérisant l'évolution de chacun des objets représentés au moyen d'Union de Boules. Ce principe, connu comme un problème de mise en correspondance, est appliqué sur des séquences d'images 3D pour l'étude des déplacements de cellules vivantes. Toujours dans le domaine de la biologie, W. TVARUSKO *et al* [TBM⁺99] décrivent une approche automatique de suivi, utilisant des principes de logique floue pour analyser le comportement de cellules vivantes à partir de séries d'images 2D. Une autre façon de considérer ce problème de suivi de primitives consiste, au moyen de techniques de flot optique [MP98, BFY00], à estimer les paramètres du mouvement à partir d'un ensemble dense d'attributs images (jusqu'au niveau pixel). Ces techniques, basées sur des systèmes d'équations différentielles, expriment la conservation d'un ensemble de propriétés liées à l'image comme une fonction du temps.

Une autre catégorie d'outils permettant d'appréhender les problématiques liées à l'imagerie 4D est basée sur les modèles déformables. Introduits en 1986 par D. TERZOPOULOS [Ter86] sous le nom de « snakes », ces modèles se définissent comme des modèles pouvant, sous l'influence de critères d'optimisation, se déformer pour segmenter [CC93, TK97, YKOT95], reconstruire [Del94, Del99], reconnaître [TWK87] ou bien encore suivre [TWK88, LL93, MT95] un objet contenu dans une image n D. Parce qu'ils sont à la fois fondamentalement dynamiques (au sens évolutif) et directement *connectables* aux données images pour contraindre l'évolution des modèles, ils procurent un véritable et puissant cadre d'étude pour les images 4D [MD00a, MD00b].

L'originalité de notre approche réside, quant à elle, dans l'extension au domaine 4D d'un modèle déformable surfacique gérant les changements de topologie. La réalisation en a été effectuée de manière appropriée afin de proposer des solutions aux problèmes posés par le suivi et la

représentation d'objets qui peuvent changer de topologie. Notre proposition s'appuie sur un modèle déformable intégrant à la fois la gestion spécifique des changements de topologie et la gestion des contraintes temporelles afin d'assurer un meilleur suivi des différents objets. Enfin, elle offre de nombreuses possibilités en matière de visualisation en combinant les informations géométriques, topologiques et symboliques liées à l'évolution des objets en mouvement.

3 Présentation du système

Le système est articulé autour d'un modèle déformable offrant aux utilisateurs la possibilité d'analyser et de visualiser l'ensemble des événements qui s'y déroulent.

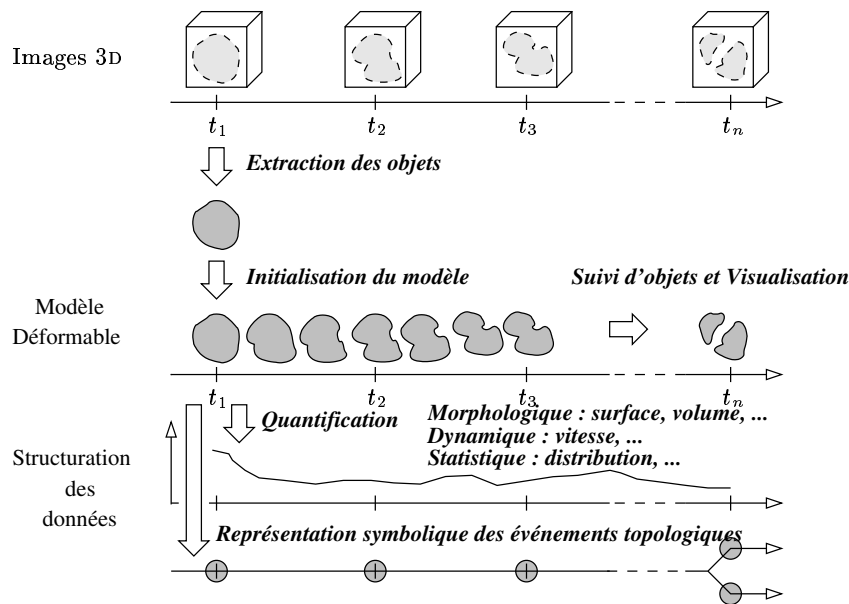


Figure 1: Illustration des différents étapes intervenant dans le traitement des images 4D.

Son fonctionnement est illustré sur la figure 1 qui dresse une vue globale du système. Il consiste, à partir de la première image de la série, à tout d'abord extraire et organiser l'ensemble des objets que l'on souhaite voire évoluer de telle manière qu'il soit possible de les faire correspondre avec les objets de l'image suivante. Cette étape de tracking doit sa difficulté au fait que chacun des objets peut voir sa topologie changer : apparition d'un trou, scission, fusion avec un autre objet ou même une combinaison de tous ces cas de figure.

Conjointement à cette étape, un ensemble de descripteurs (forme, volume, vitesse, ...), préalablement fixés par l'utilisateur, est évalué sur chacun des objets et intégré au sein d'une structure contenant l'information de continuité. Cette structure, semblable à un graphe, est générée au vol pendant le processus de tracking. Une fois ce graphe généré, il devient possible d'observer et d'analyser les séquences qui viennent d'être traitées en les visualisant notamment grâce à des outils que nous avons là aussi développés spécifiquement.

Notre choix quant au modèle déformable s'est porté sur le δ -snake [Lac98, LM99] introduit par J-O. LACHAUD en 1998. La justification de ce choix tient dans les points suivants :

- c'est un modèle structurellement simple puisque basé sur un maillage triangulaire ;
- méthodologiquement, la cohérence de ce maillage est assurée par trois règles de distance ;
- les changements de topologie sont aisément traités.

3.1 Le δ -snake

Le δ -snake doit son nom au paramètre δ qui gouverne sa structure. Il s'agit d'un modèle déformable 3D capable de détecter *a priori* toute situation proche d'un changement de topologie et d'anticiper ce changement. Il est basé sur un maillage triangulaire orienté contraint suivant trois règles de distance permettant d'assurer la cohérence de ce maillage. Les deux premières contraintes imposent respectivement une longueur d'arête minimale (δ) et maximale ($2.5 * \delta$) sur l'ensemble du maillage et en assurent la régularité. La troisième définit une distance minimale ($2.5/\sqrt{3} * \delta$) entre deux sommets non voisins et permet ainsi la prédiction de collisions entre deux morceaux de surface.

Au cours de l'évolution du snake, dès lors qu'une de ces trois contraintes n'est plus respectée, des opérateurs spécifiques peuvent être invoqués pour rectifier le maillage. Ils sont à séparer en deux catégories. D'une part, les opérateurs eulériens qui préservent la topologie du maillage ; il s'agit des fusion de sommets, création de sommet et inversion d'arête. D'autre part, les opérateurs non eulériens qui réalisent les changements de topologie et sont au nombre de deux : la rupture annulaire et la rupture axiale.

3.2 Evolution du modèle

Notre modèle déformable évolue suivant un schéma classique de minimisation d'énergie. Cette énergie est la composition de deux termes. Le premier appelé énergie externe est lié aux données à reconstruire : la série des images 3D acquises au cours du temps. Le second, l'énergie interne, est associée aux propriétés géométriques du modèle. L'expression locale de cette énergie s'établit pour chaque sommet \mathbf{v} du maillage \mathcal{M} sous la forme :

$$\mathcal{E}(\mathbf{v}) = \alpha * \mathcal{E}_{ext}(\mathbf{v}) + \beta * \mathcal{E}_{int}(\mathbf{v}), \quad \alpha + \beta = 1. \quad (1)$$

Les paramètres α et β permettent de faire un compromis entre un maillage plutôt influencé par les données de l'image (\mathcal{E}_{ext}) et un maillage plutôt régulier (\mathcal{E}_{int}). Empiriquement, ils sont fixés à $\alpha = 2/3$ et $\beta = 1/3$.

L'obtention d'une solution peut se faire dans un cadre dynamique, dont le formalisme nécessite des informations supplémentaires, et requiert des calculs d'intégration numérique coûteux. La répartition de la masse, d'une part, et les efforts internes induisant le déplacement des objets, d'autre part, sont dans ce cas des paramètres nécessaires, mais sur lequel il est hasardeux de faire des hypothèses. Nous avons donc choisi de nous placer dans un cadre quasi-statique, en considérant que les déplacements sont relativement petits d'un volume au suivant. Ce cadre nous permet à la fois de s'abstraire de la nécessité d'obtenir des informations supplémentaires, et d'utiliser une méthode itérative efficace (compatible avec le temps réel) de minimisation de l'énergie.

L'énergie externe est exprimée sous la forme d'un champ de pression algébrique. Nous utilisons ainsi uniquement les valeurs d'intensité de l'image, sans avoir à calculer leur gradient. Si l'on nomme I cette image, iso l'isopotential recherché et $\vec{n}(\mathbf{v})$ le vecteur normal à un sommet \mathbf{v} , on peut calculer la force locale qui dérive de cette énergie externe :

$$\forall \mathbf{v} \in \mathcal{M}, \quad \mathcal{F}_{local}(\mathbf{v}) = clamp_{(-1,+1)}(iso - I(\mathbf{v})) * \vec{n}(\mathbf{v}). \quad (2)$$

Nous prenons en compte également la résultante globale de ce champ pression :

$$\forall \mathcal{C} \subset \mathcal{M}, \quad \mathcal{F}_{forme}(\mathcal{C}) = \frac{1}{Card(\mathcal{C})} \sum_{\mathbf{v} \in \mathcal{C}} \mathcal{F}_{local}(\mathbf{v}). \quad (3)$$

La force externe est ainsi exprimée comme la combinaison linéaire de ces deux termes :

$$\forall \mathcal{C} \subset \mathcal{M}, \forall \mathbf{v} \in \mathcal{C}, \quad \mathcal{F}_{ext}(\mathbf{v}) = \gamma * \mathcal{F}_{local}(\mathbf{v}) + \mu * \mathcal{F}_{forme}(\mathcal{C}), \quad \gamma + \mu = 1. \quad (4)$$

Le premier terme correspond empiriquement à une déformation locale, et le second à une transformation rigide. L'énergie interne correspond à la tension de la surface. Elle se dérive en une force $\mathcal{F}_{int}(\mathbf{v})$, qui tend à ramener \mathbf{v} vers le barycentre de ses voisins.

Dans notre cadre quasi-statique, nous traduisons directement les différentes forces en terme de déplacement pour chaque point de la surface. L'application de ces déplacements mène à un nouvel état qui ne satisfait pas nécessairement les contraintes constitutives du delta-snake. Le maillage est donc régularisé en appliquant les opérateurs présentés dans la section précédente, avant de procéder au calcul de l'énergie de l'itération suivante, et ce jusqu'à la convergence du modèle.

Au travers du réglage des valeurs de γ et de μ , il est alors possible de régler la déformabilité du δ -snake. Plus μ est grand, plus la transformation appliquée à l'objet est rigide. A l'extrême, quand $\mu = 1$, on se trouve dans une situation où tous les sommets de l'objet subissent exactement la même transformation. L'objet n'est plus déformé, il est seulement déplacé. Au contraire, lorsque $\mu = 0$, l'objet devient totalement libre de ses déformations et il n'y a plus aucune homogénéité. L'utilisation judicieuse de ce terme permet d'agir suivant un mécanisme de lissage temporel [MD00a].

3.3 Initialisation et suivi

L'initialisation du δ -snake peut s'effectuer selon diverses méthodes semi-automatiques comme automatiques. Notre domaine d'application se prêtant relativement bien aux méthode automatiques, nous avons retenu une méthode utilisant comme état de référence un maillage obtenu par le biais d'un « Marching Cubes ». Cet algorithme [WMW86, LC87], le plus connu en matière de reconstruction, est sans doute le moyen le plus rapide et le plus efficace d'extraire une isosurface à partir d'une image 3D.

Quelle que soit sa forme de départ, le δ -snake converge vers la forme qu'il est censé atteindre au bout de quelques dizaines d'itérations. C'est ce principe, répété successivement entre les différentes images de la série, qui permet de reproduire la continuité des phénomènes observés.

La figure 2 illustre cette idée. Lorsque le δ -snake est associé à une image n et que l'on estime, suivant un critère de convergence, qu'il est assez proche de sa solution, le fait de l'associer à l'image $n + 1$ suffit pour qu'automatiquement l'équilibre des forces soit bouleversé et que le snake se mette naturellement à la recherche d'une nouvelle position de repos. Pendant ce temps, tout un ensemble de mesures relatives aux données en cours est stocké pour être ultérieurement analysé et/ou visualisé. Enfin, notons que l'évolution du snake fournit une solution naturelle au problème de l'interpolation des formes. Par ailleurs, à l'instar des systèmes de J. MONTAGNAT et H. DELINGETTE [MD00a] ou de T. MCINERNEY et D. TERZOPOULOS [MT95], notre système est capable de suivre simultanément plusieurs objets pouvant changer de topologie.

4 Résultats

Nous présentons ici quelques résultats obtenus à partir de deux séquences d'images.

La première séquence présentée est une acquisition intitulée *SeqM6* et composée de 10 images dans lesquelles deux nucléoles se séparent pendant une mitose. La figure 2 montre dans sa partie supérieure deux image I_6 et I_7 avant et après la scission. Les maillages extraits \mathcal{M}_6 et \mathcal{M}_7 sont montrés dans la partie inférieure, ainsi que trois étapes de l'évolution.

La seconde séquence présentée, *SeqM85*, est une séquence de 25 images d'une cellule en interphase. Les objets représentés sont les protéines à l'intérieur du nucléole. La figure 3 montre 4 protéines et leurs trajectoires. Notons que la protéine de droite résulte d'une scission, et que le second objet, fruit de cette scission, a disparu peu de temps après. Ceci est notamment confirmé par le graphe symbolique associé à la figure 3. Il est par contre judicieux de se poser quelques questions quant à la disparition de cet objet. On constate en effet, que lorsque les vitesses de déplacement sont trop élevées, des changements de topologie parasites (des scissions notamment) viennent perturber la bonne marche du système. Ce qui est ici détecté comme une scission ne devrait normalement pas apparaître. Ces phénomènes sont d'autant plus amplifiés que le mouvement d'un objet est trop grand comparé à sa taille.

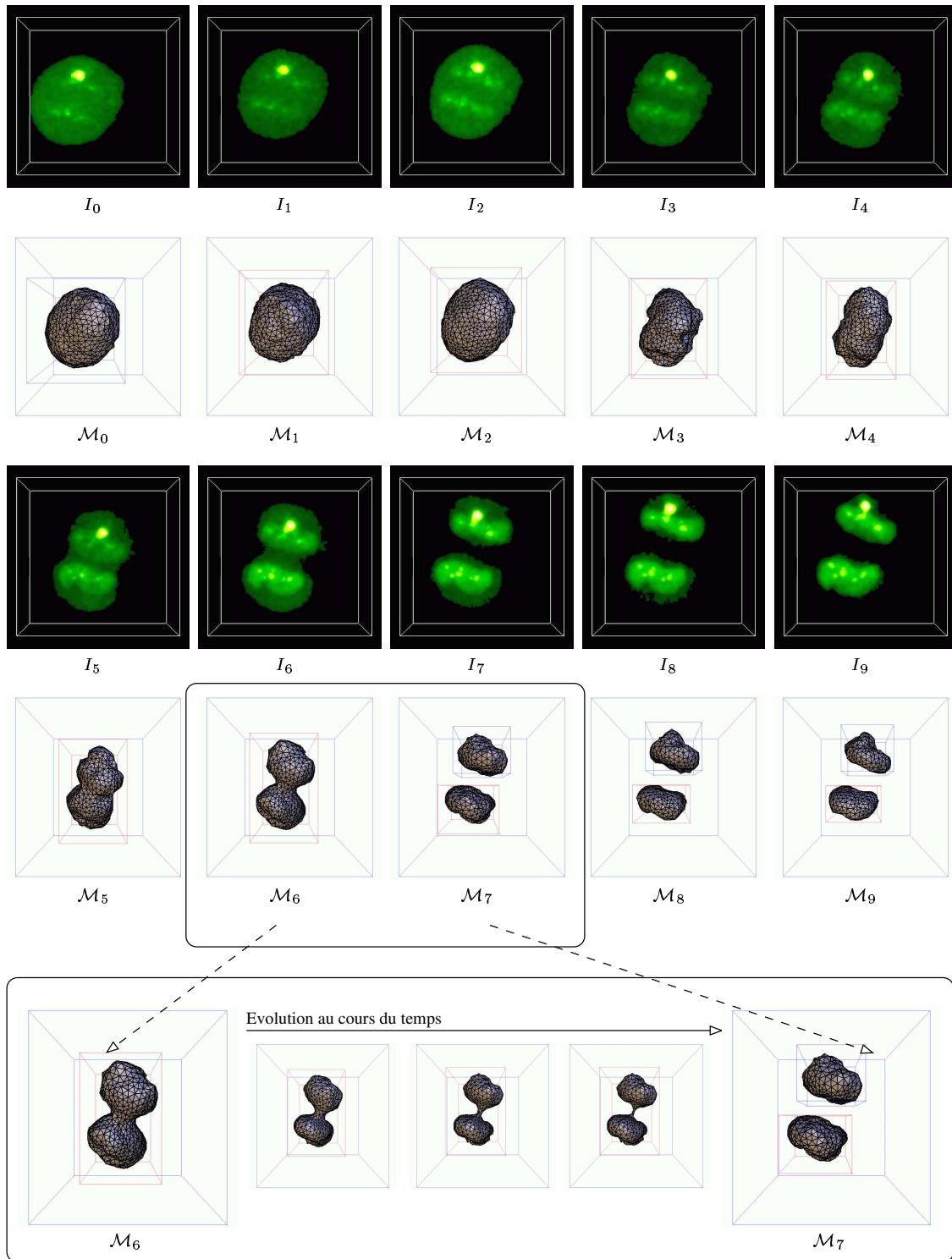


Figure 2: Suivi de l'enveloppe nucléaire d'une cellule en mitose.

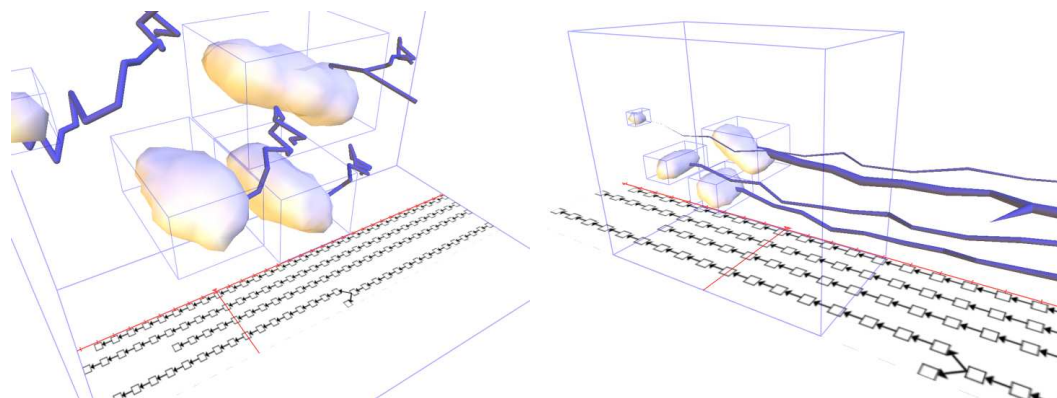


Figure 3: Sur l'image de droite, le temps est déroulé sur l'axe X.

5 Conclusion

Nous avons présenté un système original dans lequel l'extension temporelle d'un modèle surfacique déformable permet la reconstruction et la visualisation de l'évolution de cellules vivantes à travers l'analyse d'images 4D. Pour corriger les artefacts abordés dans la précédente section, nous avons commencé à travailler sur un algorithme de suivi hiérarchique d'objets.

Remerciements

Ce travail interdisciplinaire se situe à l'interface de la biologie cellulaire et l'informatique. Il repose sur une collaboration entre le groupe d'Imagerie Cellulaire, dirigé par le professeur D. PLOTON (Unité MÉDIAN, CNRS UMR 6142, Reims), et notre équipe. Cet axe de recherche, initié il y a trois ans, a été financé par l'ARERS (2000/2001) et l'est encore par l'ARC (2002/2003, Contrat n°4497).

References

- [BFY00] M.J. Black, D.J. Fleet, and Y. Yacoob. Robustly estimating changes in image appearance. *Computer Vision and Image Understanding*, 78 :8–31, 2000.
- [BLP99] E. Bittar, L. Lucas, and S. Prevost. Tracking living cells with an implicit deformable model. In *Proc. of ACM Siggraph / Eurographics Implicit Surface'99*, pages 131–164, Bordeaux, France, 1999.
- [CC93] L.D. Cohen and I. Cohen. Finite-element methods for active contour models and balloons for 2D and 3D images. *PAMI*, 15(11) :1131–1147, November 1993.
- [Del94] H. Delingette. Simplex meshes : a general representation for 3D shape reconstruction. In *Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR '94)*, June 1994.
- [Del99] H. Delingette. General object reconstruction based on simplex meshes. *International Journal of Computer Vision*, 32(2) :111–146, 1999.
- [Lac98] J.-O. Lachaud. *Extraction de surfaces à partir d'images tridimensionnelles : approche discrète et approche par modèle déformable*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, France, 1998. (en français).
- [LC87] W.E. Lorensen and H.E. Cline. Marching cubes : a high resolution 3D surface construction algorithm. *Computer Graphics (SIGGRAPH'87 Proceedings)*, 21(4) :163–169, 1987.

- [LL93] F. Leymarie and M.D. Levine. Tracking deformable objects in the plane using an active contour model. *PAMI*, 15(6) :617–634, June 1993.
- [LM99] J.-O. Lachaud and A. Montanvert. Deformable meshes with automated topology changes for coarse-to-fine 3D surface extraction. *Medical Image Analysis*, 3(2) :187–207, 1999.
- [MD00a] J. Montagnat and H. Delingette. Space and time shape constrained deformable surfaces for 4D medical image segmentation. In *Proc. of MICCAI 2000*, pages 196–205, Pittsburgh, PE, USA, 2000.
- [MD00b] J. Montagnat and H. Delingette. Spatial and temporal shape constrained deformable surfaces for 3d and 4d medical image segmentation. Technical Report RR-4078, INRIA, 2000.
- [MP98] E. Mémin and P. Pérez. Dense estimation and object-based segmentation of the optical flow with robust techniques. *IEEE Trans. on Image Processing*, 7(5) :703–719, 1998.
- [MT95] T. McInerney and D. Terzopoulos. A dynamic finite element surface model for segmentation and tracking in multidimensional medical images with application to cardiac 4D image analysis. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 19(1) :69–83, 1995.
- [SW96] D. Silver and X. Wang. Volume tracking. In *Proc. of IEEE Visualization'96 Conference*, pages 157–164, San Francisco, CA, USA, 1996.
- [SW98] D. Silver and X. Wang. Tracking scalar features in unstructured datasets. In *Proc. of IEEE Visualization'98 Conference*, pages 157–164, 1998.
- [TBM⁺99] W. Tvarusko, M. Bentele, T. Misteli, R. Rudolf, C. Kaethers, D.L. Spector, H.H. Gerdes, and R. Eils. Time-resolved analysis and visualization of dynamic processes in living cells. *Cell Biology*, 96 :7950–7955, 1999.
- [Ter86] D. Terzopoulos. Regularization of inverse visual problems involving discontinuities. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 8(4) :413–424, 1986.
- [TK97] H. Tek and B.B. Kimia. Volumetric segmentation of medical images by three-dimensional bubbles. *Computer Vision and Image Understanding : CVIU*, 65(2) :246–258, 1997.
- [TWK87] D. Terzopoulos, A. Witkin, and M. Kass. Symmetry-seeking models and 3D object reconstruction. *International Journal of Computer Vision*, 1(3) :211–221, 1987.
- [TWK88] D. Terzopoulos, A. Witkin, and M. Kass. Constraints on deformable models : Recovering 3D shape and nonrigid motion. *Artificial Intelligence*, 36(1) :91–123, 1988.
- [WMW86] G. Wyvill, C. McPheeters, and B. Wyvill. Data structure for soft objects. *The Visual Computer*, 2(4) :227–234, 1986.
- [YKOT95] A. Yezzi, S. Kichenassamy, P. Olver, and A. Tannenbaum. A geometric snake model for segmentation of medical imagery. *IEEE Trans. on Medical Imaging*, 16(2) :199–209, 1995.