

**Détection et comptage d'objets 3D coalescents en
microscopie confocale multicanaux: une méthode
basée sur la validation de modèle**

**Juhui WANG ¹, Alain TRUBUIL,
Christine GRAFFIGNE, Bertrand KAEFFER**

Rapport technique 2001-8, 19 pp.

**BIA²-Jouy
INRA
domaine de Vilvert
F-78352 Jouy-en-Josas Cedex**

¹ juhui.wang@jouy.inra.fr

² Biométrie et intelligence artificielle

Résumé : Le travail présenté dans cet article s'inscrit dans une démarche globale d'analyse de la distribution spatiale des cellules au sein de structures vivantes, observées en microscopie confocale multicanaux. Ici, on se focalise sur le problème de la détection et du comptage de cellules sur une glande du côlon chez le rat. La méthode développée est basée sur la validation d'un modèle photométrique des objets 3D. 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. Nous utilisons pour cela les outils classiques des statistiques multivariées. Les résultats obtenus sur des données réelles démontrent la pertinence de l'approche.

Mots clés : Analyse d'Image, Cytométrie, Glande Colique, Microscopie Confocale, Statistique Multivariée, Validation de Modèle.

Abstract : The work presented here is a part of a global project developed in our laboratory. It aims at the study of alive structures from 3D-multispectral confocal microscopy imaging. In this paper, we focus on the problem of detection and counting of cells inside the intestinal crypts of rats. The developed method exploits a photometric model of the observed objects. Our goal 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 algorithm is based on non-parametric multivariate statistics and has been tested using real data.

Keywords : Image Analysis, Cytometry, Intestinal Crypts, Confocal Microscopy, Multivariate Statistics, Model Validation.

1 Introduction

La microscopie confocale suscite un intérêt croissant depuis quelques années dans le domaine de la biologie, de la médecine et de la physique des matériaux et s'est révélée comme un des principaux moyens d'investigation volumique et temporelle de spécimens vivants. Elle permet le découpage optique, dans la profondeur, d'un échantillon (e.g. biologique) translucide et de ce fait, donne accès à une information tridimensionnelle au sein d'un échantillon.

On s'intéresse ici à l'analyse des glandes coliques [13, 9]. Il s'agit d'entités biologiques situées sur le côlon. Chaque glande colique a l'aspect d'une poche plus ou moins cylindrique tapissée par une couche de cellules et remplie de mucus. Une glande comporte un nombre relativement important de cellules (environ 400). Ces glandes sont le siège de processus importants pour la

compréhension et la régulation du fonctionnement de l'épithélium intestinal. Ainsi, pour le biologiste, le phénomène de prolifération cellulaire chez les mammifères est associé à une famille de macromolécules appelées *facteurs de croissance*. Ces macromolécules peuvent être marquées et observées en microscopie de fluorescence. L'étude de la répartition de ces *facteurs de croissance* sur les glandes coliques, contribue alors à la compréhension de la régulation paracrine de la croissance et de la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal [13].

L'analyse des glandes coliques n'est qu'un exemple parmi tant d'autres de l'utilisation de la microscopie confocale; il reflète cependant un type de données qu'on rencontre fréquemment en biologie cellulaire: entités coalescentes, observations multicanales. Malgré l'importance de cette technologie dans le domaine de la biologie, de la médecine et de la physique des matériaux, il reste encore beaucoup à faire au niveau du traitement d'image. La plupart des tâches courantes telles que la détection d'objet d'intérêt, la segmentation, et la quantification restent encore fortement interactives [4, 13, 20]. Les difficultés liées à une automatisation du traitement résident essentiellement dans le fait que les objets ont des structures complexes [1, 7], présentent souvent des entités coalescentes et sont partiellement observés. En outre, les images acquises comportent d'importantes hétérogénéités [1, 20] en terme de luminosité (intra et inter objet, intra et inter image, en fonction de la profondeur), de texture et de forme géométrique. Tous ces facteurs compliquent le traitement de ce type de données et compromettent la qualité des résultats obtenus. La difficulté de la tâche est bien mise en évidence au travers du travail effectué par G. Gong et B. Parvin [10]. Ces auteurs ont proposé une méthode de segmentation basée sur le groupement de primitives locales (contour et ligne de crête) tout en intégrant un *a priori* géométrique fort sur la forme de l'objet observé (forme hyperquadratique). Malgré cela, et en raison du bruit et de la trop grande variabilité géométrique des objets observés vraisemblablement, les résultats obtenus n'ont pas donné entière satisfaction.

Un petit tour d'horizon nous permet pourtant de voir qu'un certain nombre de difficultés ont été partiellement levées. Ainsi, certaines difficultés liées à la coalescence des objets ont déjà été considérées par le passé [12, 19, 7, 11] mais la plupart du temps ces auteurs opèrent sur des sections 2D de l'image. La segmentation et la détection sont parfois abordées en 3D [2, 1, 20] mais rarement dans un contexte d'objets coalescents. Ainsi, Dubuisson [7] exploite des techniques classiques de traitement d'image (seuillage, croissance de région) afin d'extraire les régions connexes d'une image et utilise des heuristiques pour séparer les objets coalescents. Il opère dans l'espace 2D. Irinopoulou [11] utilise une démarche similaire et exploite l'information de profondeur seulement dans la partie heuristique liée à la séparation des ob-

jets coalescents. Baumann [2] opère directement dans l'espace 3D. Après un filtrage médian, il réalise la segmentation proprement dite par une simple opération de seuillage, suivie d'une recherche des régions connexes dans l'espace 3D. L'efficacité de l'algorithme a été démontrée pour des objets non coalescents. Ancin [1] superpose les résultats d'une sur-segmentation avec ceux obtenus au moyen d'une sous-segmentation afin d'en extraire les objets non coalescents. Même avec l'introduction des connaissances *a priori*, certains objets coalescents ne sont pas bien séparés. Une étape interactive où l'utilisateur confirme et corrige les résultats issus de la procédure automatique est souvent nécessaire [20].

Notons enfin que, de précédents travaux [26] que nous avons réalisés sur le sujet ont démontré l'avantage de l'utilisation d'un modèle photométrique des objets, et l'intérêt de la prise en compte explicite des écarts pouvant exister entre les données d'observation et le modèle. Ces travaux exploitent seulement l'information issue d'un canal. L'extension au cas multicanaux présente des intérêts évidents mais rencontre des difficultés méthodologiques.

L'objectif de cet article est de chercher à lever ces difficultés. La méthode proposée s'appuie sur les statistiques inférentielles multivariées. Tout d'abord, les variabilités photométriques des objets 3D observés dans différents canaux sont décrites à l'aide d'un modèle probabiliste dans lequel les luminances de l'objet sont supposées Gaussiennes. L'espérance de ces lois dépendra cependant de la position de l'objet dans le volume. Ce modèle n'est pas toujours valide sur la totalité du volume occupé par les entités à détecter. Afin de contourner cette difficulté, nous cherchons à sélectionner les zones dans lesquelles le modèle est valide. Cette sélection est réalisée à l'aide d'une méthode d'inférence non-paramétrique multivariée.

Suite à cette première étape de détection de zones valides, les zones de l'objet 3D, qui correspondent au modèle supposé, sont localisées. Nous les appelons *germes* car elles sont constituées de peu de voxels. Un *germe* est donc un ensemble de voxels déclarés compatibles avec le modèle photométrique de l'objet 3D. Un objet contient généralement plusieurs *germes*. L'individualisation des objets n'est alors possible qu'après regroupement des *germes*. Cette tâche est accomplie à l'aide d'un schéma d'agrégation itérative. La démarche développée ici est assez générique même si à des fins d'illustration, nous limitons volontairement le nombre de canaux à deux et la présentation aux observations effectuées sur les glandes coliques de rat pour lesquelles les objets 3D recherchés sont les parties centrales des cellules (noyaux). Les deux canaux choisis correspondent respectivement aux marquages de l'ADN des noyaux et au marquage de récepteurs sur la membrane cytoplasmique des cellules. Ceci est illustré sur la *Figure 1* où le noyau constitue la partie plus ou moins centrale de la cellule, tandis que la membranes

cytoplasmique correspondent à la partie externe sur la figure. Le marquage n'est pas toujours suffisamment fort et la membrane peut en certains endroits apparaître un peu dissimulée dans un bruit de fond qui envahit toute la cellule.



Figure 1: *Structure d'une cellule. La partie centrale correspond au noyau tandis que la partie externe correspond à la membrane cytoplasmique.*

L'article est organisé de la façon suivante : après avoir formulé un modèle statistique qui permet de représenter les caractéristiques photométriques des cellules observées dans les deux canaux, nous allons d'abord valider ce modèle par rapport aux données observées puis discerner les cellules. Dans la dernière partie, nous présentons quelques résultats et quelques perspectives.

2 Modèle photométrique de cellule

La *Figure 2* montre deux sections prises dans l'image 3D d'une glande colique de rats. La *Figure 2.(a)* représente le marquage des noyaux et la *Figure 2.(b)* le marquage des membranes cytoplasmiques. Dans le canal des noyaux, nous pouvons voir les objets d'intérêt qui sont les structures plus ou moins elliptiques et foncées. Dans le canal du marquage des membranes cytoplasmiques, les objets d'intérêt se présentent sous formes de structures filiformes. On note aussi en certains endroits quelques taches sombres qui signalent le plus souvent un marquage du mucus.

Dans la suite de cet article, nous notons I^n l'image 3D issue du marquage des noyaux et I^m celle issue du marquage des membranes cytoplasmiques. Quand on a besoin de faire référence à la fois aux deux éléments, on utilisera le vecteur I avec $I = (I^n, I^m)^t$.

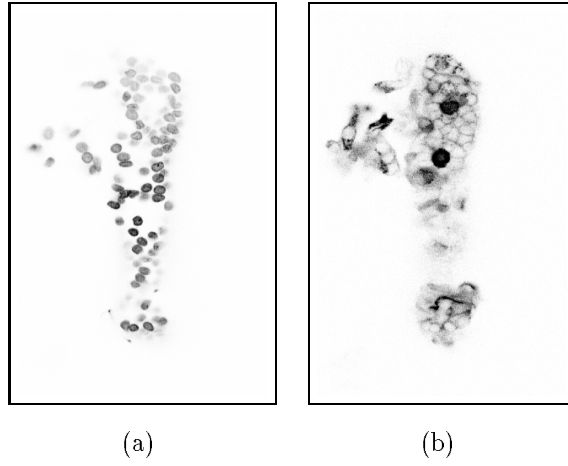


Figure 2: *Deux sections extraites de l'image 3D d'une glande colique de rats. (a) Image du marquage de l'ADN des noyaux, (b) Image du marquage des membranes cytoplasmiques.*

Les informations structurelles associées aux deux marqueurs sont complémentaires et concourent à la localisation de l'une ou l'autre des structures (noyau, membrane). Ainsi au sein du noyau, on doit avoir un marquage très faible, de l'ordre du bruit d'acquisition, dans le canal “membranaire” et *vice et versa*. Au niveau de l'image de ces structures cellulaires cela doit se traduire par :

1. un niveau de gris observé sur l'image I^n (resp. I^m) beaucoup plus faible que celui observé dans l'image I^m (resp. I^n) selon qu'on se trouve sur le noyau (ou sur la membrane).
2. un niveau de gris assez homogène au sein des structures noyau et membrane [24, 27].

Soit $\mathcal{C}$ l'ensemble des cellules d'une glande et $c \in \mathcal{C}$ une cellule particulière. Prenons l'exemple de l'image issue du marquage des noyaux. La luminance au sein de la partie centrale d'une cellule est quasi-constante. Cette valeur constante est liée à la position de la cellule dans l'image, pour des raisons liées à la technique de préparation et d'acquisition des échantillons. Nous la notons μ_c^n . Le même raisonnement s'applique à l'image I^m et μ_c^m représente la luminance de la partie centrale de la cellule c , observée dans l'image I^m . On désigne donc par $\mu_c = (\mu_c^n, \mu_c^m)^t$, le vecteur des luminances au voxel c

Soit $p \in R^3$ la position d'un voxel défini dans l'image 3D, $I_c : R^3 \rightarrow R^2$ la restriction de I sur la cellule c , et ϵ le bruit associé à la constitution de l'image. Si nous supposons que ϵ est un bruit aléatoire indépendant de p , nous avons :

$$I_c(p) = \mu_c + \epsilon \quad \forall p \in c \quad (1)$$

où ϵ suit une loi normale de centrée, de matrice de covariance Λ de taille 2×2 : $\epsilon \sim \mathcal{N}(\mathbf{0}, \Lambda)$. Dans la suite de cet article, nous considérons I_c comme un vecteur de deux variables aléatoires définie sur c sans préciser p .

Cette modélisation permet de prendre en compte le premier constat énoncé plus haut. Le deuxième constat, est traduit par la condition suivante :

$$E_n(I_c) \ll E_m(I_c) \quad (2)$$

où $E_i : i \in n, m$ représentant l'espérance de la loi marginale sur la variable i . Ce qui est équivalent à :

$$\mu_c^n \ll \mu_c^m \quad (3)$$

3 Détection de la partie centrale de cellule

Une fois le modèle de cellule précisé, la détection de la partie centrale des cellules peut être abordée au moyen de test des hypothèses. Selon le modèle défini dans les équations (1) et (2) , une condition nécessaire pour qu'un ensemble de voxels soit situé à l'intérieur d'une cellule c est :

1. les luminances d'un quelconque voxel de cet ensemble suit une distribution normale multivariée d'espérance statistique égale à μ_c , et de matrice de covariance égale à Λ .
2. $\mu_c^n \ll \mu_c^m$

En statistique inférentielle, ceci peut se ramèner à un problème de test d'hypothèse pour lequel l'hypothèse nulle est :

$$\begin{cases} H_0 : \forall p \in c, I_c(p) = \mu_c + \epsilon \\ H_0^* : \mu_c^n \ll \mu_c^m \end{cases} \quad (4)$$

avec μ_c un vecteur constant inconnu, et ϵ un bruit statistique de loi normale multivariée, centrée, et de matrice de covariance constante mais inconnue.

Les vecteurs μ_c et Λ étant inconnus, ce test n'est pas commode dans le cas de distribution multivariée. Même si l'on considère seulement la cas de H_0 , il n'existe pas de test uniformément plus puissant [18]. Deux solutions s'offrent à nous : soit on choisit de travailler sur des propriétés asymptotiques et on ne

peut pas, dans ce cas, garantir la puissance du test dérivé ; soit on cherche à décomposer le test (4) en plusieurs tests plus simples mais maîtrisables individuellement. Dans le cadre de notre travail, nous avons retenu cette la deuxième solution.

Nous avons décomposé le test (4) en trois tests univariés : le premier porte sur l'homogénéité de la luminance des voxels au sein d'une cellule, observée dans l'image I^n , le deuxième est du même type mais porte sur l'image I^m , et le troisième est basé sur la différence entre l'image I^n et I^m , il permet de prendre en compte le test H_0^* . La formulation de ces trois tests est la suivante :

$$H_0 : \forall p \in c, \quad I_c^n(p) = \mu_c^n + \epsilon^n \quad (5)$$

avec μ_c^n une valeur constante inconnue et ϵ^n un bruit Gaussien centré.

$$H_0^* : \forall p \in c, \quad I_c^m(p) = \mu_c^m + \epsilon^m \quad (6)$$

avec μ_c^m une valeur constante inconnue et ϵ^m un bruit Gaussien centré.

$$H_0^{**} : \mu_c^n \ll \mu_c^m \quad (7)$$

Supposons ϵ^n et ϵ^m indépendants, de variance identique. La réalisation des premier et deuxième tests est simple, le critère de sélection peut être formulé selon une loi de distribution χ^2 [26]. Si σ^2 est la variance commune du bruit ϵ^n et ϵ^m , il se traduit par l'équation suivante :

$$\sqrt{\chi_{0.95}^2} < \frac{\hat{\sigma}_c^n}{\sigma} < \sqrt{\chi_{0.05}^2} \quad (8)$$

ici $\hat{\sigma}_c^n$ désigne l'estimateur empirique de la variance de I_c^n , et les valeurs de χ^2 sont choisies de façon à ce que le niveau de confiance du test soit supérieur ou égal à 95%.

Le même raisonnement s'applique sur l'image I^m , nous avons :

$$\sqrt{\chi_{0.95}^2} < \frac{\hat{\sigma}_c^m}{\sigma} < \sqrt{\chi_{0.05}^2} \quad (9)$$

L'appréciation de la relation $\ll$ dans le test (7) est trop floue pour la réalisation de ce test. Nous la remplaçons par l'équation suivante :

$$H_0^{***} : \mu_c^n < \mu_c^m - 2\sigma \quad (10)$$

σ a la même signification que précédemment. Ceci revient à interdire la validation de l'hypothèse (10) si le recouvrement de deux lois normales est supérieur à 16%.

Soit alors $\nu(c)$, le nombre de voxels contenus dans la cellule c . Sachant que $I_c^n \sim \mathcal{N}(\mu_c^n, \sigma)$ et $I_c^m \sim \mathcal{N}(\mu_c^m, \sigma)$, nous avons :

$$\frac{\sum_{p \in c} (I_c^n - I_c^m)}{\nu(c)} \sim \mathcal{N}(\mu_c^n - \mu_c^m, \frac{\sigma}{\sqrt{\nu(c)}}) \quad (11)$$

La validation de l'hypothèse H_0^{***} peut alors s'effectuer selon le critère suivant :

$$\frac{\sum_{p \in c} (I_c^n - I_c^m)}{\sigma} + 2\sqrt{\nu(c)} < x_\alpha \quad (12)$$

où x_α est le quantile de la loi Gaussienne normalisé, associé au niveau de confiance $1 - \alpha$. Ici nous avons choisi $\alpha = 0.05$

Un voxel est alors déclaré comme faisant partie d'une cellule si et seulement si les critères (8), (9), et (12) sont vérifiés. Les cellules sont quant à elles constituées par les ensembles les plus grands de voxels voisins qui vérifient les critères (8), (9), et (12).

Même si, dans l'expérimentation, la valeur de σ a été considérée comme un paramètre de régularisation que l'on règle manuellement, l'application systématique de cette démarche ne donne pas des résultats satisfaisants à cause de la présence des taches à l'intérieur de cellule (voir *Figure 3*). Les taches ne sont pas compatibles avec le reste de la cellule et sont incohérentes avec le modèle défini dans les équations (1) et (2). L'origine de ces taches est très diverse. Elle peut être liée soit à la procédure de préparation des échantillons biologiques, soit à la procédure d'acquisition. Ces taches doivent être prises en compte dans la suite du traitement.

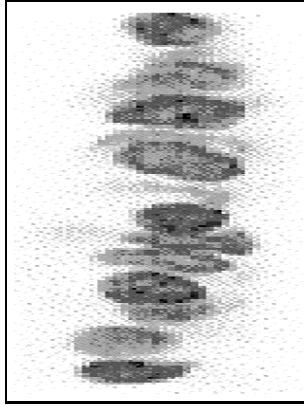


Figure 3: *Image détaillée de cellules observées dans le canal du marquage des noyaux. On peut observer la structure intrinsèque des noyaux, et constater la présence des taches à l'intérieur des noyaux.*

Cette difficulté peut être partiellement levée selon différentes stratégies reposant soit sur des pré-traitements [6, 17], soit sur des statistiques robustes [3]. Ici nous développons une stratégie basée sur la validation de modèle [25, 21, 14] qui permet non seulement d'éliminer les aberrations de données liées aux taches mais aussi de prendre en compte les éventuelles erreurs de la modélisation. Pour cela, nous déplaçons un cube de taille fixe dans le volume de la glande colique, et nous cherchons à appliquer les tests (8), (9), et (12) 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'une cellule. Notons que, dans l'analyse de glandes présentées dans la section 5, la taille du cube utilisée est de $5 \times 5 \times 3$ alors que le paramètre σ est ajusté fixé manuellement. La valeur 21 pour σ^2 donne des résultats satisfaisants.

4 Étiquetage des cellules

Après la première phase, nous avons obtenu un ensemble de *germes* situés à l'intérieur des cellules. Une cellule peut contenir plusieurs *germes*. La suite du travail consiste à regrouper, en une seule entité, l'ensemble de *germes* faisant partie d'une même cellule. Nous appréhendons ce problème au moyen d'un ensemble de conditions déduites des connaissances *a priori* que nous avons sur les entités à détecter. La satisfaction des contraintes que nous décrivons ci-dessous est assurée par un schéma d'agrégation itératif.

4.1 Formulation du problème

Étant donné deux ensembles de *germes* G et F , on pose comme condition nécessaire d'appartenance à une même cellule 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 de la cellule la plus grande.

Selon l'hypothèse formulée dans l'équation (1), la prise en compte de la première condition peut être formulée au moyen d'un test d'homogénéité des échantillons d'une loi normale multivariée.

Soit g un *germe* avec $g \in G \cup F$. Si G et F appartiennent à une même cellule, nous avons :

$$H_0 : \forall g \in G \cup F, \begin{cases} \mu_g = \mu_0 \\ \Lambda_g = \Lambda_0 \end{cases} \quad (13)$$

ici μ_0 et Λ_0 sont des vecteurs constants inconnus, et μ_g et Λ_g correspondent respectivement à l'espérance et à la matrice de covariance de I_g qui est définie comme la restriction de I sur g .

Selon le principe du rapport de vraisemblance maximale, l'hypothèse (13) peut être évaluée selon la statistique λ définie comme suit :

$$\lambda = \frac{n^{nq/2} \prod_{i=1}^q |A_{ii}|^{n_i/2}}{\prod_{i=1}^q n_i^{pn_i/2} |\sum_{i=1}^q A_{ii} + \sum_{i=1}^q N_i (\bar{I}_{i.} - \bar{I}_{..})(\bar{I}_{i.} - \bar{I}_{..})^t|^{n/2}}$$

où

- p désigne le nombre de canaux pris en compte ($p = 2$, ici).
- $q = \nu(G \cup F)$ représente le nombre de *germes* contenus dans $G \cup F$.
- N_i est le nombre de voxels contenus dans le *germe* i avec $i = 1, 2, \dots, q$.
Dans le cadre de notre étude, N_i a une valeur constante qui correspond à la taille du cube utilisé, c.f. section 3.
- $n_i = N_i - 1$.
- $n = \sum_{i=1}^q n_i$.
- $N_i \bar{I}_{i.} = \sum_{j=1}^{N_i} I_{ij}$ où $I_{ij} = (I_{ij}^n, I_{ij}^m)^t$ représente le vecteur de luminances du voxel j dans le *germe* i avec $j = 1, 2, \dots, N_i$.
- $N \bar{I}_{..} = \sum \sum I_{ij}$ avec $N = \sum_{i=1}^q N_i$.
- $A_{ii} = \sum_{j=1}^{N_i} (I_{ij} - \bar{I}_{i.})(I_{ij} - \bar{I}_{i.})^t$.
- et $|\cdot|$ est le déterminant d'une matrice.

L'hypothèse H_0 sera rejetée avec un niveau de confiance égal à $1 - \alpha$ lorsque $-2 \log \lambda$ est supérieur à une valeur x_α définie selon :

$$P[-2 \log \lambda \leq x_\alpha] = 1 - \alpha \quad (14)$$

Le calcul de x_α s'effectue à l'aide de l'approximation asymptotique de Box [15] correspondant à la somme d'un ensemble de lois χ^2 . La formule

utilisée pour le calcul de x_α est assez complexe, nous renvoyons les lecteurs intéressés aux articles spécialisés [5, 15, 21].

La deuxième condition est prise en compte plus simplement :

$$\left(\sum_{p \in G \cup F} 1_{\mathcal{E}}(p) \right) < T_0 \quad (15)$$

où T_0 est une valeur seuil et $1_{\mathcal{E}}$ désigne la fonction indicatrice de la surface $\mathcal{E}$ des cellules de la glande. Notons que la surface des cellules n'est pas connue *a priori*; nous avons estimé $\mathcal{E}$ à partir des contours extraits de l'image [22]. En pratique, seul le contour calculé à partir de l'image I^n est utilisé. Nous avons choisi de ne pas intégrer les contours extraits de l'image I^m , car la qualité de ces derniers est assez inhomogène dans les données. $1_{\mathcal{E}}(p)$ prend donc la valeur 1 si p est sur un contour calculé et 0 sinon.

La troisième condition est prise en compte 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'une même cellule seulement s'il existe un ellipsoïde S_{GF} , de taille prédéfinie, qui englobe tous les *germes* contenus dans G et F . La taille de S_{GF} doit être choisie de sorte qu'elle corresponde à un peu près à la taille de la plus grande cellule de la glande colique. Ceci se traduit par :

$$\forall g \in G \cup F, \quad g \in S_{GF} \quad (16)$$

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

4.2 Implémentation

Dans l'implémentation algorithmique, les cellules sont différenciées à l'aide d'un ensemble d'étiquettes, les *germes* considérés comme faisant partie d'une même cellule porteront une même étiquette, tandis que les *germes* considérés comme faisant partie des cellules différentes porteront des étiquettes différentes. On balaye les *germes* séquentiellement, on cherche à regrouper les *germes* à partir des trois conditions énoncées ci-dessus (13), (15), et (16). À l'itération courante, certains *germes* sont déjà regroupés, et portent donc une même étiquette. On appelle *groupe*, un ensemble de *germes* regroupés. Un *groupe* est donc un ensemble de *germes* associés à une même cellule. Il représente en fait un résultat intermédiaire obtenu par la procédure d'étiquetage. À la fin de cette procédure, les *groupes* deviendront des cellules identifiées. L'algorithme a été implémenté de la façon suivante :

1. À l'initialisation, chaque *germe* forme un *groupe* et porte une étiquette différente. Il y a donc autant d'étiquettes que de *germes*.

2. On balaye les *groupes* séquentiellement. Pour chaque *groupe* G , on calcule d'abord S_G , un ellipsoïde centré au barycentre des germes, de taille constante v_0 prédéfinie. $\mathcal{F}_G$ désigne l'ensemble des *groupes* inclus dans S_G . On cherche ensuite à regrouper G avec $\hat{F}$, un des *groupes* de S_G , défini par:

$$\hat{F} = \underset{F \in \mathcal{F}_G}{\text{Arg min}} ||G - F|| \quad (17)$$

où $||G - F||$ représente la distance entre le *groupe* G et F . On choisit comme distance la plus petite distance entre deux *germes* quelconques respectivement dans F et G (voir aussi la *Figure 4*). $\hat{F}$ est en fait le *groupe* le plus proche de G inclus dans S_G .

Une fois $\hat{F}$ calculé, on cherche à tester les deux autres conditions (13) et (15). On regroupe $\hat{F}$ dans G seulement si les condtions (13) et (15) sont aussi vérifiées.

3. On réitère l'étape (2) jusqu'il n'y a plus de fusion possible entre les *groupes*.

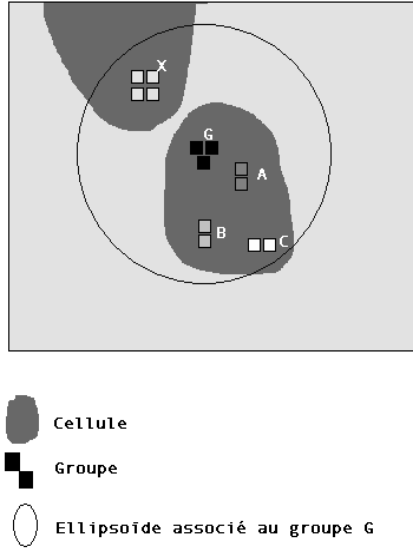


Figure 4: *Illustration de la stratégie de fusion par rapport au groupe G . Dans cette configuration, $\mathcal{F}_G = \{ A, B, C, X \}$, et $\hat{F} = A$. Selon la méthode développée, il est très probable que A soit regroupé avec G .*

Pour l'instant, le choix de v_0 est manuel; il correspond à peu près au volume de la cellule la plus grande de la structure analysée. Pour les deux glandes présentées dans la section 5, on choisit $v_0 = 22 \times 22 \times 14$.

5 Résultats et discussion

L'algorithme développé a été testé sur des données réelles. Deux de ces résultats sont reportés ici.

La *Figure 5.(a)*, *(b)*, *(c)*, et *(d)* montrent les résultats obtenus sur la première glande. La *Figure 5.(a)* illustre la détection des *germes* projetée sur l'image du canal correspondant au marquage des noyaux. 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.

Une autre difficulté inhérente à l'imagerie en microscopie confocale est la perte de précision dans l'axe de la profondeur (en z). Plus le plan focal est profond, moins bonne est l'information restituée par le dispositif d'acquisition. Quand le plan focal dépasse certaines limites en profondeur, la perte d'énergie est telle que le signal émis par l'entité et provenant de cette profondeur n'est plus perceptible. La méthode développée dans cet article permet d'éliminer automatiquement le fond de l'image grâce au modèle défini dans l'équation (2). Dans la *Figure 5.(b)*, on peut constater d'une part la perte de précision dans la profondeur, et d'autre part l'absence des *germes* détectés dans la partie supérieure de la glande à cause de cette perte de précision. D'une façon générale, la perte de précision en microscopie confocale forme un champs de biais lent et continue qui peut être corrigé à l'aide des techniques d'élimination de tendance [8, 23]. C'est un des aspects sur lesquels nous travaillons actuellement.

La *Figure 5.(c)* montre le résultat d'étiquetage des cellules. La valeur de α liée au critère de sélection (14) est fixée à 0.5, ce qui correspond à un niveau de confiance supérieur ou égal à 95%. La valeur de T_0 est fixée à 155, ce qui suppose qu'il existe au moins 155 voxels de type contour entre deux noyaux (seuls les contours extraits de l'image du canal correspondant au marquage des noyaux sont utilisés). Cela correspond à environ 6% du volume moyen des noyaux qui est de $16 \times 16 \times 10$. Sur la *Figure 5.(c)*, chaque cellule étiquetée est marquée 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 de cellule; ceci est dû à la fois à l'asymétrie de la forme des cellules et à la distribution non-homogène des *germes* détectés à l'intérieur de celles-ci. Par ailleurs, on peut remarquer l'absence d'étiquetage "visible" de certaines cellules sur les *Figure 5.(c)*. Cette absence ne dévalorise absolument pas la qualité de l'étiquetage, mais est plutôt liée aux difficultés de présentation des résultats (voir les commentaires sur la *Figure 5*). Puisque nous ne cherchons pas à segmenter les cellules, nous ne connaissons pas, à

l'issue de l'étiquetage, la surface exacte des cellules. Il est donc très difficile de mettre en évidence les cellules correctement étiquetés au moyen de visualisations 2D. La construction d'images de synthèse exploitant l'opacité (voir *Figure 5.(d)*) donne des indications mais n'est pas suffisante même lorsqu'on considère plusieurs points de vue dans la scène 3D. Nous envisageons d'autres techniques de validation s'appuyant sur une analyse de la répartition spatiale des objets 3D ou encore 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 [16].

Les *Figures 6.(a), (b), et (c)* montrent les résultats obtenus sur une deuxième glande.

Les discussions énoncées ci-dessus montrent à la fois les difficultés du problème et l'ampleur des efforts qui restent à accomplir. Néanmoins, 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.

6 Remerciement

Les auteurs remercient vivement Charles Kervrann et Sylvie Huet pour les discussions et pour leurs remarques constructives.

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] P. H. Baumann, T. Schormann, and T. M. Jovin. Three dimensional component labeling of digital confocal microscope images enumerates replication centers in BrdUrd labeled fibroblasts. *Cytometry*, 13:220–229, 1992.
- [3] 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.
- [4] J.J. Capowski. *Computer techniques in neuroanatomy*. Plenum Press, New York, 1989.

- [5] T. C. Chang, P. R. Krishnaiah, and J. C. Lee. Approximation to the distributions of the likelihood ratio statistics for testing the hypotheses on covariance matrices and mean vectors. In: *R. P. Krishnaiah, ed., Applications of Statistics*, pages 97–103, 1977.
- [6] T. Crimmins. The geometric filter for speckle reduction. *Applied Optics*, 24(10):1438–1443, May 1985.
- [7] M.P. Dubuisson, A. K. Jain, and M. K. Jain. Segmentation and classification of bacterial culture images. *Journal of Microbiological Methods*, 19:279–295, 1994.
- [8] A. M. Fenstad, A. Lundervold, and T. Taxt. Bayesian tissue segmentation with outlier detection, parameter updating, and signal inhomogeneity correction. In *6th Meeting of the ISMRM*, 18-24th, April 1998.
- [9] T.G. Gerike, U. Paulus, C.S Potten, and M. Loeffler. A dynamic model of proliferation and differentiation in the intestinal crypt based on a hypothetical intraepithelial growth factor. *Cell Prof.*, (31):93–110, 1998.
- [10] 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.
- [11] T. Irinopoulou, J. Beil, M. Nicolopoulou, P. Encaoua, and J.P Rigaut. Three dimensional DNA image cytometry by confocal scanning laser microscopy in thick tissue blocks of prostatic lesions. *Cytometry*, 27:99–105, 1997.
- [12] A. K. Jain, S.P. Smith, and E. Backer. Segmentation of muscle cell pictures: A preliminary study. *Pattern Anal. Mach. Int.*, 3:232–242, 1980.
- [13] B. Kaeffer, M. Hoebeke, A. Trubuil, C. Kervrann, M.F. Devaux, and C. Cherbut. Three-dimensional organization of normal and cancerous intestinal tissues cultured in rotating bioractor and analyzed by multi-dimensional microscopy imaging. In *6th Internet World Congress for Biomedical Science*, 14-15th, February 2000.
- [14] 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.

- [15] P. R. Krishnaiah and J. C. Lee. Likelihood ratio tests for mean vectors and covariance matrices. In: *R. P. Krishnaiah, ed., Handbook of Statistics*, 1:513–570, 1980.
- [16] J. Lund and M. Rudemo. Models for point processes observed with noise. *Biometrika*, 87(2):235–249, June 2000.
- [17] S. Masnou and J. M. Morel. Level lines based dis-occlusion. In *IEEE International Conference on Image Processing*, Chicago, USA, 1998.
- [18] A. Monfort. *Cours de statistique mathématique*. Economica, Paris, 1997.
- [19] L. O’Gorman and A. C. Sanderson. The wedge filter technique for convex boundary estimation. *Pattern Anal. Mach. Int.*, 7:326–332, 1985.
- [20] 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.
- [21] J. Portillo-García, I. Trueba-Santander, G. de Miguel-Vela, and C. Alberola-López. Efficient multispectral texture segmentation using multivariate statistics. *Inter. J. Comp. Vision.*, 145(5), October 1998.
- [22] J. Shen and S. Castan. Edge detection based on multi-edge models. In *Proceeding of SPIE’87*, Cannes, France, 1987.
- [23] M. Styner, C. Brechbühler, G. Székely, and G. Gerig. Parametric estimation of intensity inhomogeneities applied to MRI. *MI*, 18(3):153–165, 2000.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] J. Wang, A. Trubuil, and C. Graffigne. Détection d’objets 3D coalescents en microscopie confocale. In *18ème GRETSI*, Toulouse, FRANCE, Septembre 2001.
- [27] 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.

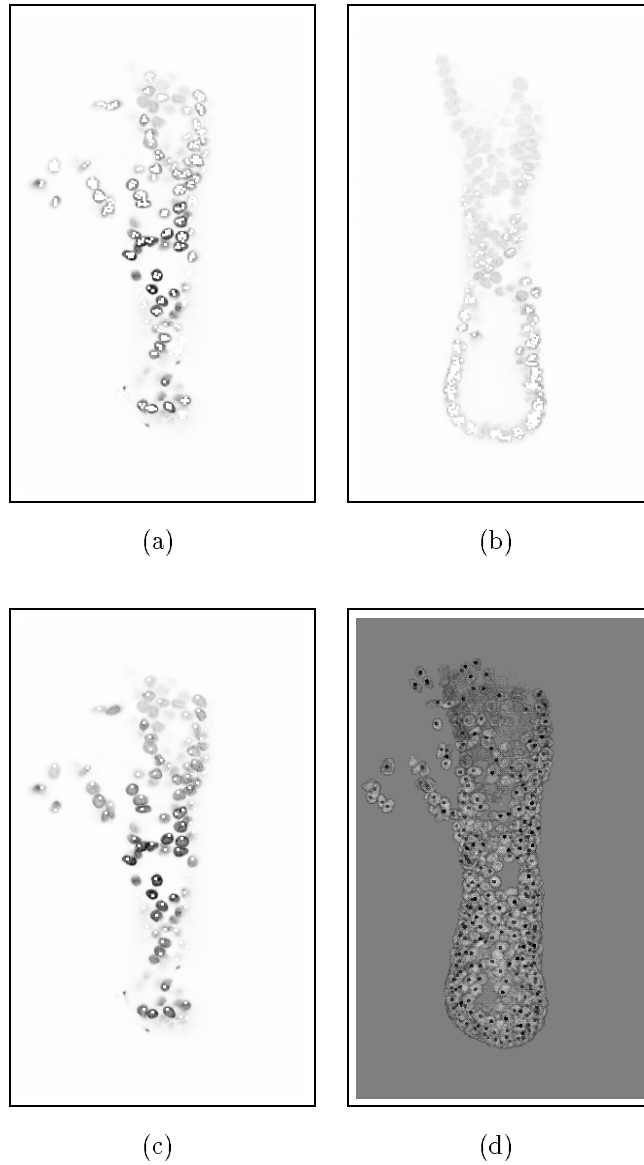
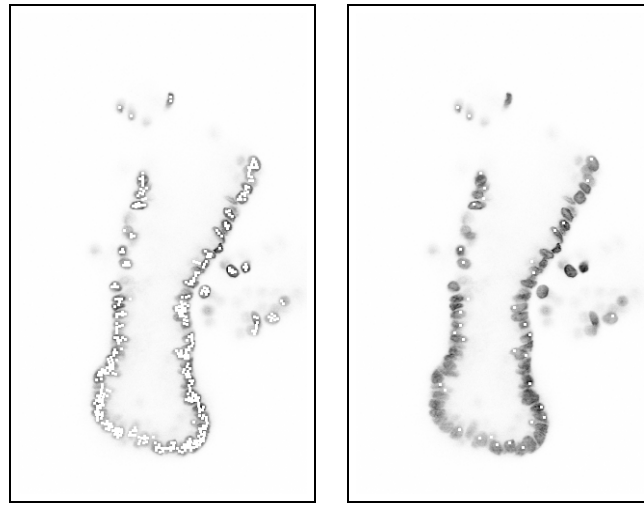
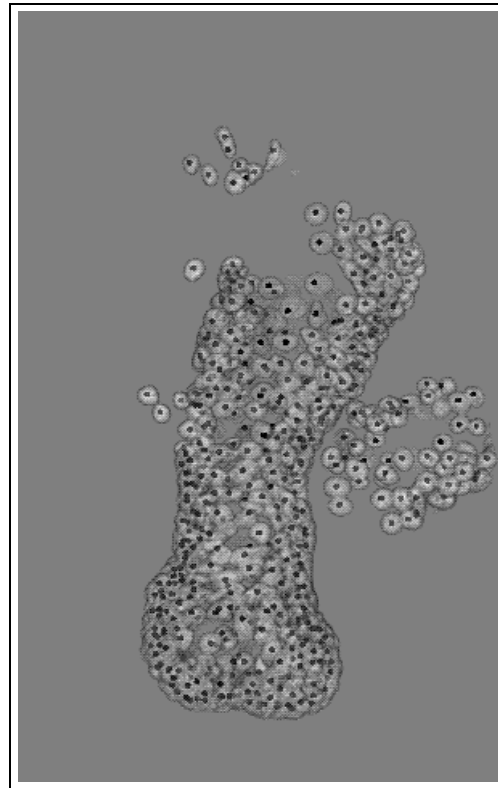


Figure 5: *Résultats obtenus sur une glande colique de rats. (a) Germes détectés; (b) Phénomène de perte de précision dans la profondeur en microscopie confocale. Dans la partie haute de la glande, la perte de précision est telle que le signal est difficilement perceptible. (c) Cellules étiquetées. Certaines cellules correctement étiquetées ne sont pas visibles ici à cause des difficultés liées à la nature 3D du problème. Par exemple, la cellule isolée, qui se trouve tout à fait en haut et à gauche de l'image, est correctement étiquetée. Par contre, son étiquetage n'est pas visible ici (les germes détectés sont visibles sur l'image (a)). En fait, le barycentre calculé à partir des germes associés à cette cellule se trouve sur d'autres sections 2D de l'image. (d) Rendu volumique des données et des cellules étiquetées.*



(a)

(b)



(c)

Figure 6: Résultats obtenus sur une deuxième glande colique de rats. (a) Germes détectés; (b) Cellules étiquetées. Nous avons choisi une section au milieu de la pile 3D afin de montrer la difficulté du problème liée à la coalescence des objets. On peut constater ici l'entassement et la déformation importante des cellules dues à la compétition des cellules pour occuper les espaces disponibles. (c) Rendu volumique des données et des cellules étiquetées.