

Caractérisation par analyse d'images de l'angiogenèse sur des coupes histologiques

Sophie LE MAIRE¹, Silvia BLACHER², Jean-Michel FOIDART², Jacques VERLY¹

¹Groupe de Traitement du Signal

Université de Liège, Sart-Tilman, B28, 4000 Liège, Belgique

²Laboratoire de biologie des tumeurs et du développement

Université de Liège, Sart-Tilman, CHU, Tour de Pathologie +3, 4000 Liège, Belgique

Sophie.leMaire@ulg.ac.be, Silvia.Blacher@ulg.ac.be

jmfoidart@ulg.ac.be, Jacques.Verly@ulg.ac.be

Résumé – De nouveaux algorithmes d'analyse d'images pour détecter et mesurer un réseau vasculaire à partir d'images de coupes histologiques sériées obtenues par microscopie optique sont présentés. Après avoir extrait les vaisseaux sanguins, les images binaires résultantes sont recalées et empilées pour reconstruire l'image du réseau vasculaire tridimensionnel. La méthode développée évalue quantitativement différents paramètres de la géométrie vasculaire à partir des images à deux et à trois dimensions. Ces mesures permettent de caractériser le processus de stimulation/inhibition de la structure vasculaire.

Abstract – New image processing algorithms for the detection and measurement of a vascular network from images of histological sections obtained by optical microscopy are presented. After extraction of the blood vessels, the resulting binary images are registered and stacked to reconstruct the tridimensional vascular network image. The developed method evaluates quantitatively different parameters of the vascular geometry from images at two and three dimensions. These measurements allow characterizing the process of stimulation/inhibition of the vascular structure.

1 Introduction

L'angiogenèse est le processus biologique par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux pré-existants [1]. Ce processus, illustré par la figure 1, est essentiel au développement normal des tissus en assurant l'apport d'oxygène et en éléments nutritifs et l'élimination des déchets du métabolisme cellulaire. Elle est particulièrement importante et indispensable dans divers processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, l'implantation, la placentation [2] mais aussi pathologiques, comme dans le cas du cancer où elle est essentielle à la croissance tumorale [3] [4]. La géométrie de la nouvelle vascularisation reflète le processus de l'angiogenèse et peut changer considérablement. Le résultat du processus de l'angiogenèse est généralement caractérisé par l'aire relative occupée par les vaisseaux sanguins dans des coupes histologiques.

Le but de ce travail est de développer une méthode assistée par ordinateur évaluant quantitativement différents paramètres de la géométrie vasculaire en utilisant des coupes histologiques.

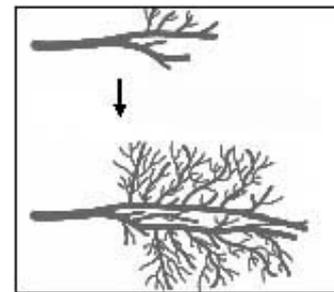


FIG. 1: angiogenèse

2 Matériels et méthodes

2.1 Microscopie

Les coupes histologiques sont observées avec un microscope optique Zeiss Axiovert 25 à un grossissement 25 fois.

2.2 Traitement d'images

Les logiciels utilisés pour réaliser ce travail sont les suivants : (a) APHELION v.3.2 pour le traitement d'images à 2D, la reconstruction 3D et les mesures à 2D et à 3D, (b) MATLAB v.6.5. pour le recalage des images, indispensable avant d'effectuer la reconstruction 3D des réseaux vasculaires, et l'analyse statistique des résultats. L'algorithme développé pourrait aussi être implémenté sans difficulté dans tout autre logiciel contenant les outils de base d'analyse d'images.

3 Résultats et discussion

3.1 Traitements d'images

La figure 2 donne un exemple d'image correspondant à une coupe histologique. Dans ce travail, nous nous intéressons à la détection et la quantification des vaisseaux sanguins. L'algo-

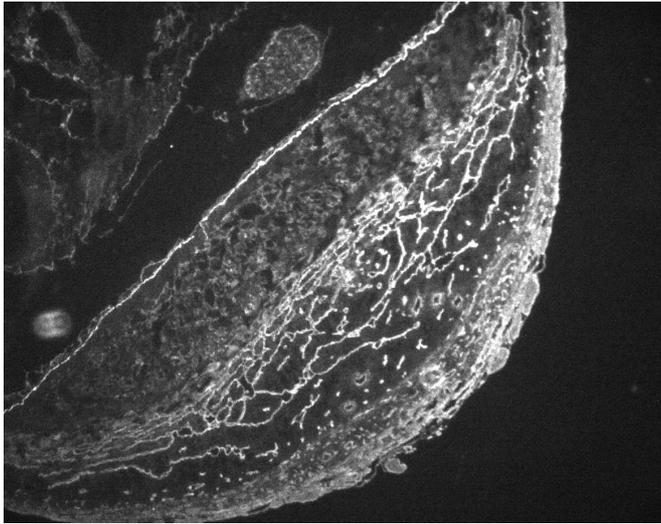


FIG. 2: exemple de coupe histologique

l'algorithme utilisé pour extraire les vaisseaux sanguins est résumé dans l'organigramme de la figure 3. Il est important de noter que la diversité des images du point de vue de leur apparence et de leur qualité rend difficile d'établir un programme complètement automatique. Cependant, nous avons développé un programme paramétrique semi-automatique qui requiert l'interaction de l'utilisateur par l'intermédiaire de boîtes à dialogue à différentes étapes du traitement.

Une difficulté majeure dans la détection des vaisseaux sanguins à partir de coupes histologiques est la position des vaisseaux par rapport au plan de la coupe. En effet, un vaisseau perpendiculaire à ce plan sera représenté par une forme circulaire sur l'image, contrairement à un vaisseau parallèle qui apparaîtra sous une forme longiligne. L'algorithme permettant l'extraction des vaisseaux, représenté par l'organigramme de la figure 3, a été conçu en tenant compte de ce problème. Il se compose de trois étapes.

La première étape a pour objectif d'extraire la majorité des vaisseaux circulaires et longilignes. Les résultats intermédiaires successifs sont montrés dans la figure 3 (Images 1a–1b) et les différentes opérations sont détaillées ci-dessous.

- Une détection de contour est réalisée en appliquant un gradient de Sobel [5] à l'image d'entrée. L'opérateur utilisé pour calculer le gradient de Sobel extrait les pixels dont les amplitudes du gradient obtenues par les noyaux de Sobel sont au moins égales au seuil défini. Cela implique donc de choisir un seuil. Vu les grandes variations d'intensité de luminosité, l'utilisateur choisit le seuil interactivement, ce qui permet une meilleure détection des vaisseaux en fonction de l'image traitée.
- Un algorithme de seuillage automatique (figure 3, 1a) est ensuite utilisé pour maximiser le contraste global des contours [6]. Cet opérateur sélectionne automatiquement les seuils qui maximisent le contraste moyen global des contours détectés par les seuils d'un côté à l'autre de l'image. Il est appliqué récursivement, sélectionnant les seuils supplémentaires en ignorant les contours détectés par les seuils précédemment sélectionnés. Ces seuils sont alors appliqués sur l'image de départ. Cet algorithme utilise l'information locale au lieu de l'histogramme glo-

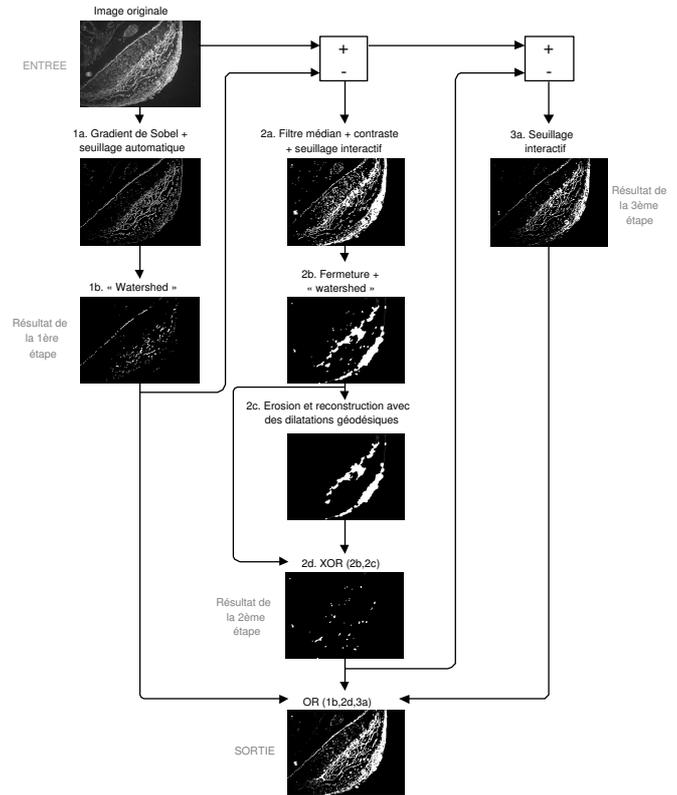


FIG. 3: organigramme du traitement pour extraire les vaisseaux sanguins

bal, ce qui implique qu'il est moins sensible au manque d'uniformité de l'éclairage du microscope.

- Pour détecter les vaisseaux comme des régions sur lesquelles nous pourrions par la suite calculer une série de mesures, l'algorithme de segmentation par ligne de partage des eaux, appelé « watershed », est appliqué [7] (figure 3, 1b).

La deuxième étape détecte les vaisseaux sanguins circulaires. Les résultats intermédiaires successifs sont montrés dans la figure 3 (Images 2a–2d) et les différentes opérations sont détaillées ci-dessous.

- Cette étape commence par une soustraction de l'image de sortie de la première étape à l'image d'entrée. L'image résultante conserve les vaisseaux qui restent à extraire.
- Un filtre médian [5] permet de réduire le bruit dans l'image. Le voisinage utilisé ici est un voisinage 5x5.
- Pour augmenter le contraste de l'image, un filtre morphologique de contraste est appliqué. Ce filtre utilise un élément structurant (disque de rayon 3).
- L'image est alors binarisée avec un seuil choisi interactivement (figure 3, 2a). Le seuillage utilisé ici est un seuillage par bornes inférieure et supérieure [8]. L'image résultante contient les vaisseaux sanguins recherchés ainsi que des régions indésirables.
- Une transformation de fermeture morphologique [9] a pour but de remplir les régions entourées de contours fermés. L'élément structurant utilisé est un disque de rayon 2.

- L'application du watershed [7] extrait les vaisseaux circulaires (figure 3, 2b).
- Les régions indésirables restantes sont extraites plus loin en reconstruisant l'image en utilisant l'image source érodée comme marqueur (figure 3, 2c). Cette opération érode l'image 2b de la figure 3 et reconstruit l'image 2c de la figure 3 sous celle-ci en effectuant des dilations géodésiques [9]. Cette opération peut être utilisée dans les mêmes situations qu'une ouverture morphologique [9], mais a l'avantage de préserver les contours vu que la reconstruction récupère ce qui a été perdu après l'érosion.
- Un OR exclusif logique (XOR) (figure 3, 2d) est alors appliqué entre les images 2b et 2c de la figure 3 pour soustraire les régions indésirables à partir de l'image résultant du « watershed ».

La troisième étape est optionnelle et peut être appliquée par l'utilisateur à travers une boîte à dialogue, si tous les vaisseaux sanguins ne sont pas détectés. Le résultat de cette étape est montré dans la figure 3 (Image 3a).

- L'image de départ est l'image d'entrée à laquelle on a soustrait les résultats des deux premières étapes (figure 3, 1b et 2d).
- Un seuillage interactif est alors utilisé. Il s'agit d'un seuillage par bornes inférieure et supérieure [8].

Finalement, nous appliquons un OR logique entre les résultats des trois étapes (figure 3, 1b, 2d et 3a). Cette image constitue l'image binaire finale sur laquelle les mesures sont réalisées.

3.2 Recalage d'images et reconstruction 3D

Lorsque les coupes histologiques sont réalisées en forme série, on peut réaliser une reconstruction 3D de l'objet étudié. Dans le cas où ces coupes ne sont pas alignées parfaitement, les images en niveaux de gris correspondantes doivent être recalées. Ce recalage des images successives est réalisé manuellement en utilisant des paires de points.

Pour recalcr une image par rapport à une autre, on sélectionne tout d'abord des points de repère par l'intermédiaire d'une interface graphique illustrée à la figure 4 où l'image de droite est l'image de référence, et celle de gauche l'image à recalcr. A partir des points de repère sélectionnés, la transformation géométrique à appliquer à l'image non recalée est déduite. Parmi les différents types de transformation possibles, notre choix se limite à une transformation rigide, c'est-à-dire une transformation qui se compose uniquement de translation et de rotation. Et enfin, cette transformation est appliquée à l'image à recalcr.

Pour recalcr toutes les images d'un même échantillon, cette méthode de recalage est d'abord appliquée sur les deux premières coupes en prenant la première comme image de référence. Ensuite, lorsque la deuxième image est recalée, la méthode est à nouveau appliquée sur la deuxième et la troisième coupe en choisissant la deuxième image comme image de référence. Et ainsi de suite.

Les images en niveaux de gris étant recalées, le programme de traitement d'images (section 3.1) est appliqué sur ces images pour obtenir les images binaires correspondantes. La reconstruction tridimensionnelle peut alors être réalisée. Pour cela,

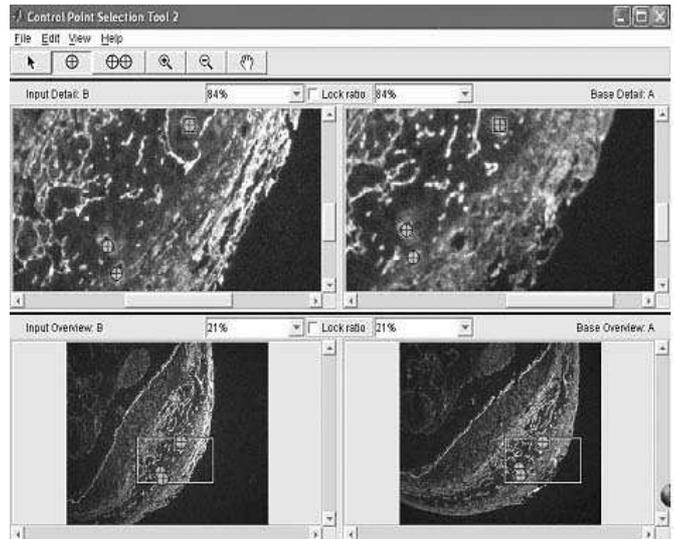


FIG. 4: interface pour sélectionner les points de repère



FIG. 5: exemple d'une reconstruction 3D

les images binaires des coupes histologiques successives sont empilées et le résultat est visualisé. La figure 5 présente un exemple de reconstruction 3D d'un réseau vasculaire.

3.3 Mesures sur l'image

À titre d'exemple, des mesures réalisées à partir des images 2D et 3D de coupes histologiques de la partie maternelle du placenta de souris déficientes ou non pour le gène PAI-1 (Inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1) sont présentées. Elles permettent de caractériser le processus de l'angiogenèse. Ce modèle est utilisé parce que la souris est le meilleur modèle génétique expérimental de mammifère étudié. De plus, les structures des placentas de souris et d'humain sont groupées dans la même catégorie [10].

Les mesures suivantes ont été réalisées : (a) la distribution de surface des vaisseaux, (b) la distribution de surface de Crofton des vaisseaux, (c) la distribution de volume des vaisseaux, (d) la distribution de surface spécifique des vaisseaux, où la surface spécifique est le rapport entre la surface de Crofton et le

volume, et (e) les densités surfacique et volumique des vaisseaux, notées ϵ_s et ϵ respectivement. Une comparaison entre les densités surfacique et volumique permet de déterminer l'homogénéité de la distribution des vaisseaux.

Remerciements

Sophie le Maire remercie le F.R.I.A. (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture) pour lui avoir accordé une bourse de recherche PhD. Ce travail était aussi soutenu par les subventions de la Communauté française de Belgique (Actions de Recherches Concertées), la Commission des Communautés Européennes (FP5 n° QLK3-CT02-02136, FP6), le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgique), la Fédération Belge Contre le Cancer, la Coopération C.G.R.I.-F.N.R.S.-INSERM, les Fonds spéciaux de la Recherche (Université de Liège), le Centre Anticancéreux près l'Université de Liège, les FB Assurances, la Fondation Léon Frédéricq (Université of Liège), la D.G.T.R.E. de la « Région Wallonne », les Fonds d'Investissements de la Recherche Scientifique (CHU, Liège, Belgique), le Programme « Pôles d'attraction interuniversitaires (PAI) » - Politique scientifique fédérale (Bruxelles, Belgique), et la Société Roche Diagnostics (GmbH) (Penzberg, Allemagne).

Références

- [1] J. Folkman, H. Brem. *Angiogenesis and inflammation*. In: J.I. Gallin, I.M. Goldstein, and R.S. Snyderman, eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press, 809-39, 1992.
- [2] J.C. Cross, Z. Werb, S.J. Fisher. *Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle*. *Science* 266 (5190): 1508-18, 1994.
- [3] J. Folkman. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. *Nature Med* 1: 27-31, 1995.
- [4] J. Folkman, M. Klagsbrun. *Angiogenic factors*. *Science* 235: 442-7, 1987.
- [5] J.C. Russ. *The Image Processing Handbook*. 3rd ed., CRC Press, 1999.
- [6] R. Kholer. *A Segmentation System Based on Thresholding*. *Computer Graphics and Image Processing* 15: 319-38, 1981.
- [7] P. Soille. *Morphological image analysis: principles and applications*. Berlin: Springer, 230-9, 1999.
- [8] M. Coster, J.L. Chermant. *Précis d'analyse d'images*. Presses du CNRS, 1989.
- [9] J. Serra. *Image analysis and mathematical morphology*. Volume 1, Academic Press, 1988.
- [10] P. Georgiades, A.C. Ferguson-Smith, G.J. Burton. *Comparative development anatomy of the murine and human definitive placentae*. *Placenta* 23: 3-19, 2002.