

Application de la Factorisation en Matrices Non-négatives à l'élimination de l'autofluorescence des tissus biologiques

Anne-Sophie MONTCUQUET¹, Lionel HERVÉ¹, Jean-Marc DINTEN¹, Jérôme I. MARS²

¹CEA, LETI, Laboratoire d'Imagerie et Systèmes d'Acquisition
17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

²GIPSA-Lab, Département Images-Signal
Rue de la houille blanche BP46, 38402 Saint Martin d'Hères, France
anne-sophie.montcuquet@cea.fr

Résumé – L'imagerie optique de fluorescence dans les milieux diffus s'est révélée depuis plusieurs années être un outil prometteur pour de nombreuses applications médicales. Nous utilisons ici des mesures spectrales afin de séparer différentes sources fluorescentes. Pour la détection chez l'homme de fluorophores en profondeur (4 cm), il s'avère utile de s'affranchir de tout signal parasite qui pourrait interférer avec le signal de fluorescence spécifique émis par le fluorophore, notamment la fluorescence intrinsèque des tissus biologiques (ou autofluorescence). Une approche spectroscopique est choisie, basée sur la méthode de séparation de sources aveugle de Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN), pour séparer des spectres qui se chevauchent et ainsi isoler la fluorescence spécifique de l'autofluorescence. Cette méthode considère ces deux signaux comme deux sources distinctes à séparer et requière seulement des spectres initiaux, mis à jour par des lois multiplicatives. La FMN a permis de séparer la fluorescence spécifique de l'autofluorescence des tissus sur des données expérimentales.

Abstract – Fluorescent imaging in diffusive media is an emerging modality for medical applications. Here, we use spectrally resolved measurements in order to separate several fluorescence sources. As we want to examine deep (4 cm) fluorophores for human applications, a very weak optical signal is measured and any interference to it may limit the sensitivity of the system. It is thus useful to filter any parasite signal, such as the intrinsic biological tissues fluorescence, called autofluorescence, which mixes with the fluorophore-specific signal. A spectroscopic approach, based on the Non-negative Matrix Factorization (NMF) method, is explored to unmix overlapping spectra and thus isolate the specific fluorescence signals from the autofluorescence signal. This blind source separation method treats specific fluorescence and autofluorescence as different sources to separate; it only needs initial spectra, updated over iterations thanks to regularized multiplicative update rules. Fluorescence contributions of intrinsic fluorescence and specific fluorescence have been satisfactorily isolated on experimental data.

1 Introduction

Depuis quelques années, l'imagerie optique de fluorescence offre la perspective de systèmes de diagnostic de cancers, non invasifs et peu coûteux. Des marqueurs fluorescents sont injectés au sujet et se fixent aux tumeurs recherchées. Pour localiser ces marqueurs, on éclaire la zone d'intérêt à la longueur d'onde d'excitation optimale pour le fluorophore et la pénétration en profondeur dans le milieu, puis on recueille un signal de fluorescence. Comme le montre la théorie de la propagation dans les milieux diffus, le signal utile diminue exponentiellement avec la profondeur. Ainsi, pour des applications au diagnostic chez l'homme où la fluorescence recherchée est profonde (quelques centimètres), le signal spécifique de fluorescence recherché est souvent masqué par des signaux parasites tels que la fluorescence naturelle du tissu, ou autofluorescence.

Le développement d'algorithmes de séparation de spectres adaptés représente une des possibilités de s'affranchir de ce signal parasite. L'algorithme utilisé dans ce papier pour séparer l'autofluorescence de la fluorescence spécifique est basé sur

une méthode de séparation de sources aveugle, appelée Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN). La FMN factorise une matrice en deux autres matrices qui portent des informations sur les différents spectres qui composent la matrice initiale.

La FMN n'a été, à notre connaissance, appliquée au domaine de la spectroscopie de fluorescence qu'une seule fois [2, 3] (sans qu'un fluorophore soit injecté au sujet) bien qu'elle soit un outil pertinent pour la séparation de spectres dans le domaine de l'imagerie optique de fluorescence. Dans ce papier, la FMN ainsi que les résultats de séparation de fluorescence spécifique et d'autofluorescence obtenus sur nos données expérimentales sont présentés.

2 Théorie

Gobinet est le premier à avoir utilisé la FMN en spectroscopie de fluorescence [2, 3, 4]. Cette méthode impose des contraintes de positivité (ce qui la différencie notamment d'autres méthodes de séparation de sources telle la Décompo-

sition en Valeurs Singulières (DVS)) sur les coefficients des matrices utilisées, et cherche à minimiser une *fonction objectif*. L'énoncé mathématique de la FMN est le suivant :

Etant donné une matrice non-négative $X \in \mathbb{R}^{N_x \times N_\lambda}$, trouver les matrices non-négatives $A \in \mathbb{R}^{N_x \times P}$ et $S \in \mathbb{R}^{P \times N_\lambda}$ telles que :

$$X \simeq AS \quad (1)$$

Par matrice non-négative nous entendons une matrice dont tous les éléments sont non-négatifs, et P représente le nombre de sources fluorescentes à distinguer.

La décomposition est obtenue en minimisant une fonction objectif Q^{FMN} . La distance euclidienne entre X et AS [6] peut par exemple être utilisée :

$$Q^{FMN} = \|X - AS\|^2 \quad (2)$$

ou :

$$Q^{FMN} = \sum_{i=1}^{N_x} \sum_{j=1}^{N_\lambda} (x_{ij} - \sum_{p=1}^P a_{ip}s_{pj})^2 \quad (3)$$

La fonction Q^{FMN} a 0 pour borne inférieure. Le problème à résoudre est alors de minimiser $\|X - AS\|^2$ en respectant les contraintes $A, S \geq 0$.

Dans ce but, nous utilisons les lois de mise à jour des matrices A et S définies par Lee et Seung [5]. Ces lois, inspirées des travaux sur la Factorisation en Matrices Positives [7, 2] et l'Espérance-Maximisation [1], respectent les contraintes de positivité et minimisent la fonction objectif. Elles assurent en effet que la fonction Q^{FMN} décroît au cours des itérations et converge vers un minimum local. Leur écriture est la suivante (entre parenthèse sont indiquées les itérations) :

$$a_{ip}^{(n+1)} = a_{ip}^{(n)} \frac{(XS^{T(n)})_{ip}}{(AS^{(n)}S^{T(n)})_{ip}} \quad (4)$$

et

$$s_{pj}^{(n+1)} = s_{pj}^{(n)} \frac{(A^{T(n+1)}X)_{pj}}{(A^{T(n+1)}A^{(n+1)}S^{(n)})_{pj}} \quad (5)$$

3 Instrumentation et méthodes

3.1 Dispositif expérimental

Un laser plan à 690 nm illumine un objet suivant une ligne Xd (voir Figure 1) et le signal de fluorescence est détecté suivant cette même ligne Xd par un spectromètre imageur couplé à une caméra CCD à la verticale de l'objet.

3.2 Données acquises

Une expérience sur souris est réalisée : un tube capillaire rempli de 5 μl d'Indocyanine Green (ICG) à 10 μM ($10 \mu\text{M}$ est utilisé comme marqueur fluorescent), est placé sous la peau du dos de la souris (voir Figure 2, à gauche) afin de simuler une tumeur marquée. L'animal est illuminé par le laser à 690 nm étendu

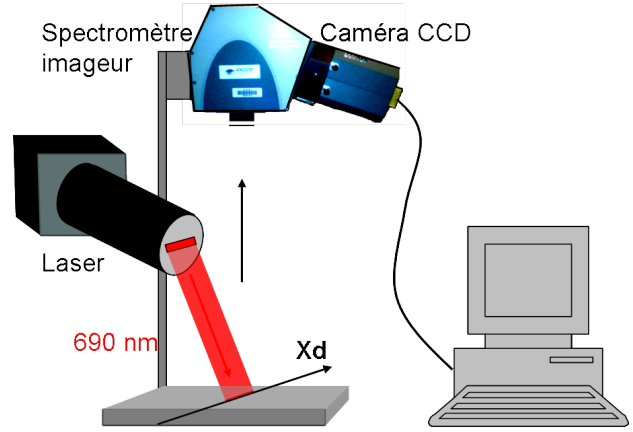


FIGURE 1 – Schéma du dispositif expérimental

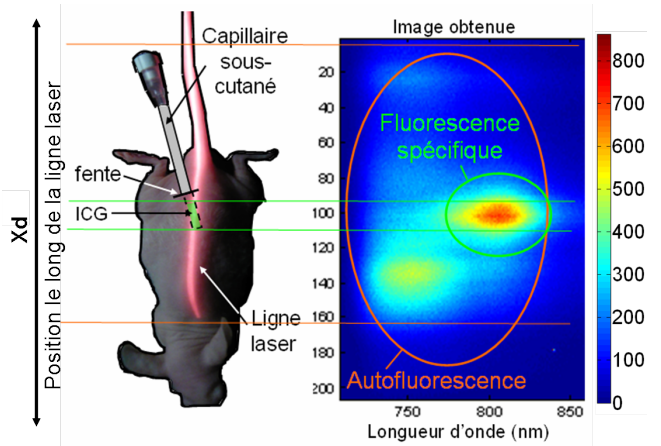


FIGURE 2 – A gauche : capillaire d'ICG placé sous-cutané au niveau du dos d'une souris. A droite : image obtenue, autofluorescence et fluorescence à séparer

selon une ligne. La fluorescence émise est collectée au dessus de l'animal par le spectromètre imageur couplé à la caméra CCD. L'acquisition de fluorescence obtenue est présentée sur la Figure 2, à droite. Deux parties prédominantes se dégagent : **i) l'autofluorescence de la souris**, présente tout le long de la ligne, autour de 750 nm, et **ii) la fluorescence spécifique**, plus locale, autour de 820 nm (longueur d'onde caractéristique du pic d'ICG).

Ici, nous utilisons la FMN pour éliminer l'autofluorescence dont le spectre de fluorescence recouvre en partie le spectre de fluorescence spécifique d'ICG, et ne garder ainsi que le signal spécifique permettant de localiser l'inclusion.

3.3 FMN appliquée aux données spectrales

La FMN permettant de séparer un signal non-négatif en composantes distinctes elles-aussi non-négatives, la méthode est bien adaptée aux mesures spectrales. Pour notre application, la

décomposition par la FMN d'un signal acquis X en $X \simeq AS$ peut être interprétée physiquement :

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & \dots & x_{1,N_\lambda} \\ \vdots & & \vdots \\ x_{N_x,1} & \dots & x_{N_x,N_\lambda} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ \vdots & \vdots \\ a_{N_x,1} & a_{N_x,2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} s_{11} & \dots & s_{1,N_\lambda} \\ s_{21} & \dots & s_{2,N_\lambda} \end{pmatrix} \quad (6)$$

Lorsque le signal est supposé formé de deux sources de fluorescence distinctes, S contient les formes des spectres en longueur d'onde et A contient le poids de ces spectres pour chaque position spatiale, comme schématisé sur la représentation suivante :

$$\begin{matrix} \text{ligne}_1 \\ \vdots \\ \text{ligne}_{N_x} \end{matrix} \begin{pmatrix} X \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ \vdots & \vdots \\ a_{N_x,1} & a_{N_x,2} \end{pmatrix} \begin{matrix} A \\ S \end{matrix} \begin{matrix} s_1 \\ s_2 \end{matrix}$$

Chaque ligne de la matrice X est une combinaison linéaire des spectres s_1 et s_2 :

$$\text{ligne}_i = a_{i1} \times s_1 + a_{i2} \times s_2 \quad i \in (1, N_x) \quad (7)$$

Ainsi, la FMN appliquée à nos données spectrales retourne une matrice S qui contient des informations sur les spectres de fluorescence du fluorophore et de l'autofluorescence présents dans l'image de départ X , et une matrice A qui définit la pondération de ces spectres de fluorescence dans chacune des lignes de X .

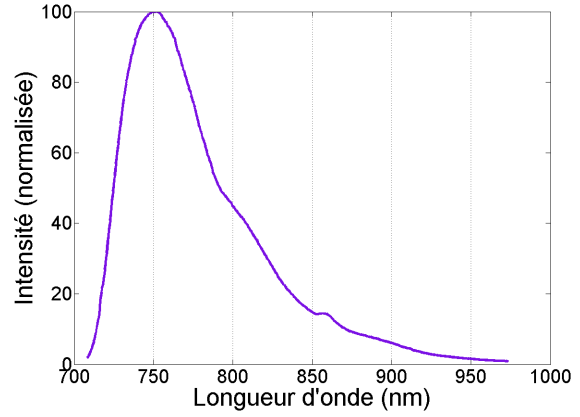
3.4 Algorithme

L'algorithme de FMN est un algorithme itératif, dont les étapes sont les suivantes : dans un premier temps, les deux matrices A et S doivent être définies. Pour des raisons de robustesse, contrairement à Gobinet [2, 3] qui utilise des matrices aléatoires, la matrice S est ici initialisée par une matrice composée de spectres moyens d'autofluorescence et d'ICG adaptés d'expériences passées (Figure 3). De tels spectres modèles ont été obtenus directement en moyennant d'anciens résultats issus d'échantillons d'ICG *ex vivo* (pour la fluorescence spécifique), ou de plusieurs souris (pour l'autofluorescence).

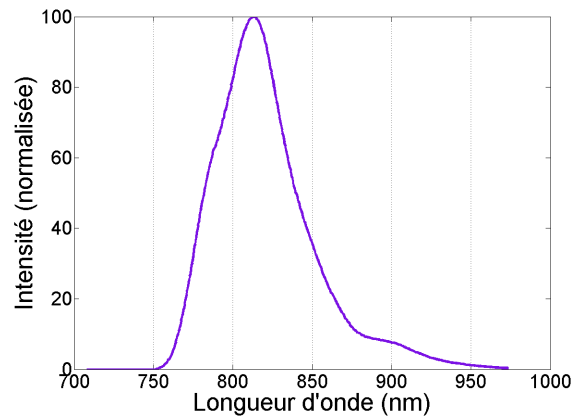
Dans un second temps, la fonction objectif est minimisée en appliquant les lois de mise à jour multiplicatives de Lee et Seung [5] (cf. 4 et 5) décrites précédemment, qui permettent de mettre à jour à tour de rôle les matrices A et S .

4 Résultats et discussion

L'algorithme de FMN a été appliqué aux données expérimentales, en utilisant des spectres de fluorescence initiaux d'ICG et d'autofluorescence présentés précédemment (Figure 3) : on note que le spectre de l'autofluorescence recouvre partiellement le spectre de fluorescence de l'ICG.



(a) Spectre modèle d'autofluorescence



(b) Spectre modèle d'ICG

FIGURE 3 – Spectres de fluorescence d'autofluorescence et d'ICG choisis pour initialiser A et S

Après convergence, la matrice S est composée de deux spectres, présentés Figure 4 (lignes continues) et comparés aux spectres initiaux (lignes pointillées). Deux images sont obtenues, la première représentant la contribution d'ICG (Figure 5 résultante, (a)) et la seconde la contribution d'autofluorescence résultante (Figure 5 résultante, (b)).

Après FMN, l'ICG est correctement isolé de l'autofluorescence, bien que leur spectres de fluorescence se chevauchent. Les spectres obtenus sont proches de leurs modèles initiaux (Figure 4). Une variation remarquable et attendue est observée entre le spectre initial de l'autofluorescence et le résultat obtenu après FMN : en effet, le spectre initial de l'autofluorescence est un modèle grossier obtenu à partir de moyennes de résultats passés provenant de différents animaux, c'est pourquoi il n'est pas étonnant d'obtenir des spectres d'autofluorescence différents d'un sujet à un autre. L'autofluorescence d'une souris peut dépendre de facteurs très variables d'un animal à l'autre, tels le pH ou encore la nourriture ingurgitée au préalable. Le spectre d'ICG obtenu est quant à lui plus proche du spectre initial, les quelques variations pouvant être attribuées à l'existence de solutions multiples au problème de

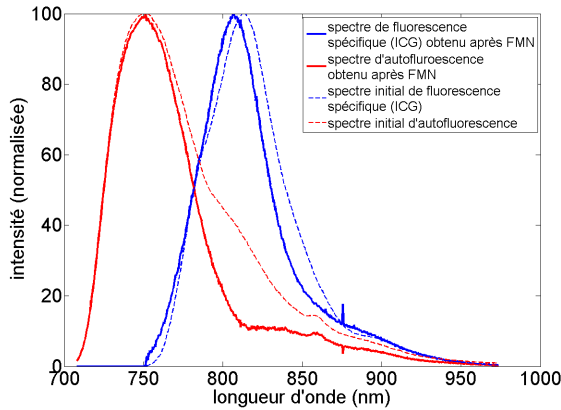


FIGURE 4 – Spectres résultants et initiaux de la matrice S

départ. Dans les futurs travaux, on pourra s'intéresser à restreindre l'ensemble de solutions en ajoutant des contraintes à la fonction objectif (en l'occurrence ici la distance euclidienne), en imposant par exemple une distance maximale entre les spectres d'ICG initial et d'ICG résultant.

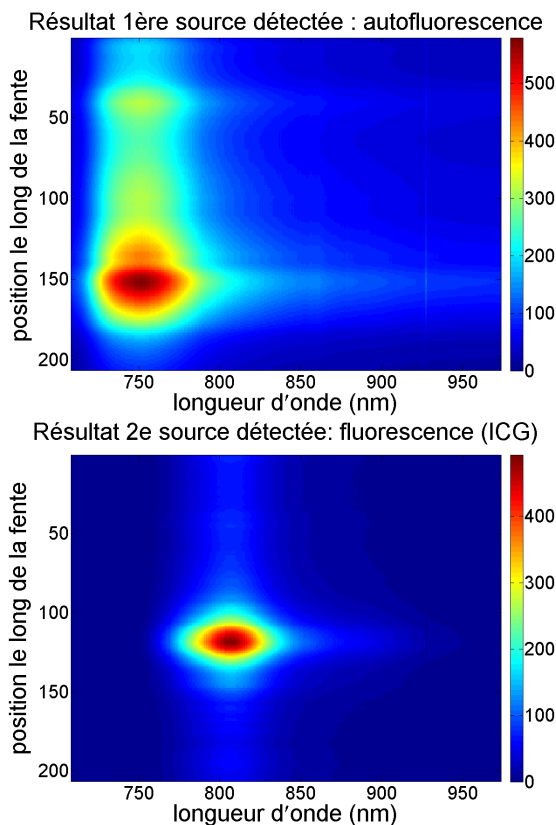


FIGURE 5 – En haut : autofluorescence détectée, en bas : fluorescence spécifique (ICG) détectée

Comparée à d'autres méthodes de séparation de sources (Décomposition en Valeurs Singulières, Moindres Carrés) testées sur les mêmes données, la FMN s'est révélée être la méthode la plus appropriée (les spectres et leurs pondérations

obtenus étaient les plus proches de ceux attendus et les plus plausibles), et est particulièrement bien adaptée aux acquisitions spectrales puisque toutes les données sont non-négatives. C'est de plus, grâce aux lois de mise à jour multiplicatives (4 et 5) une méthode simple à implémenter et qui converge rapidement.

5 Conclusions

Une expérience sur souris a été menée afin de juger de la capacité de la FMN à séparer la contribution d'un fluorophore (ICG) de la fluorescence naturelle des tissus. Pour cela, un tube capillaire rempli d'ICG simulant une tumeur marquée a été placé sous-cutané sur une souris ; le but de l'expérience était alors de séparer les contributions de fluorescence spécifique et d'auto fluorescence.

La FMN s'est avérée être un outil efficace pour la séparation de spectres de fluorescence. Cette méthode a en effet été capable de séparer deux spectres de fluorescence de niveaux d'intensité comparables, malgré leur chevauchement partiel provoqué par des gammes de longueur d'onde d'émission proches.

L'application de la FMN à la spectroscopie de fluorescence représente une avancée pour la détection d'inclusions fluorescentes en milieu diffusif en permettant de s'affranchir du signal parasite d'auto fluorescence présent chez tout sujet vivant. Cette méthode pourrait à l'avenir être utile pour la détection de tumeurs chez l'homme.

Références

- [1] A.P. Dempster, N.M. Laird, D.B. Rubin, et al. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society*, 39(1) :1–38, 1977.
- [2] C. Gobinet. *Application de techniques de séparation de sources à la spectroscopie Raman et à la spectroscopie de fluorescence*. PhD thesis, URCA Reims, 2006.
- [3] C. Gobinet, E. Perrin, and R. Huez. Application of non-negative matrix factorization to fluorescence spectroscopy. Eusipco, Technische Universität, 2004.
- [4] C. Gobinet, V. Vrabie, O. Piot, and M. Manfait. Prétraitements et méthodes de séparation de sources pour l'analyse des spectres raman issus d'échantillons biologiques. *IRBM*, 29(1) :13 – 19, 2008.
- [5] D.D. Lee and H.S. Seung. Algorithms for non-negative matrix factorization. *Advances in neural information processing systems*, 13 :556–562, 2001.
- [6] P. Paatero. Least squares formulation of robust non-negative factor analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 37(1) :23–35, 1997.
- [7] P. Paatero and U. Tapper. Positive matrix factorization : A non-negative factor model with optimal utilization of error estimates of data values. *Environmetrics*, 5(2) :111–126, 1994.