

# Filtrage 3D non-linéaire pour la détection de microstructures biologiques à l'échelle nanométrique

ALEXANDRA PACUREANU<sup>1,2,3</sup>, AYMERIC LARRUE<sup>1,2</sup>, ZSOLT PETER<sup>1</sup>, CHANTAL MULLER<sup>1</sup>, VASILE BUZULOIU<sup>3</sup>, FRANÇOISE PEYRIN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CREATIS-LRMN, INSA-Lyon; Inserm U630; CNRS UMR5220; Université de Lyon; Université Lyon 1; F-69621, France

<sup>2</sup> ESRF, Imaging Group, BP 220 38043 Grenoble Cedex 9 France

<sup>3</sup> Université POLITEHNICA de Bucarest, LAPI, Bucarest, Roumanie

<sup>1,2</sup>[joitapac@esrf.fr](mailto:joitapac@esrf.fr), <sup>1,2</sup>[larrue@esrf.fr](mailto:larrue@esrf.fr), <sup>2</sup>[peterzsl3@yahoo.com](mailto:peterzsl3@yahoo.com), <sup>1,2</sup>[peyrin@esrf.fr](mailto:peyrin@esrf.fr)

L'investigation sur les aspects cellulaires du tissu osseux est généralement effectuée à partir de techniques microscopiques 2D. Les progrès récents en micro-tomographie par rayonnement synchrotron permettent imager des échantillons biologiques à une échelle infra-micrométrique. Dans ce papier, nous proposons d'analyser la faisabilité de cette technique pour étudier le système lacuno-canaliculaire osseux. Ce système consiste en un réseau complexe de canaux minuscules (~ 300 nm de diamètre) qui rejoint les lacunes ostéocytaires. À cause de la résolution spatiale faible du système d'acquisition d'images par rapport à la taille des structures et vu les contraintes en terme de dose, les images ont un rapport signal sur bruit faible et la détection des canalicules est difficile. Nous proposons une technique de filtrage 3D non-linéaire basée sur l'analyse hessienne. Nous présentons des résultats sur des images synthétiques et nous montrons pour la première fois un rendu 3D du réseau lacuno-canaliculaire basé sur des données expérimentales.

## 1 Introduction

L'ostéoporose est une maladie de la fragilité osseuse qui touche une femme sur trois et un homme sur cinq, âgés de plus de 50 ans, affectant de manière significative l'espérance et la qualité de vie. Au niveau cellulaire, le système ostéocytaire joue un rôle important dans le remodelage osseux qui est le processus clé dans les maladies du tissu osseux [1]. Les ostéocytes, les cellules osseuses les plus nombreuses, sont hébergées dans des espaces ellipsoïdaux appelés lacunes, et communiquent entre elles par de minuscules canaux appelés canalicules. Ce réseau assure la transmission des signaux mécano-électrochimiques dans l'os et sa caractérisation pourrait permettre une meilleure compréhension de la fragilité osseuse [2].

Jusqu'à présent, les études sur le système ostéocytaire ont principalement été menées à l'aide de techniques microscopiques en 2D. Les rares études 3D ont été réalisées grâce à la microscopie confocale. Toutefois, les échantillons sont limités en épaisseur à quelques dizaines de micromètres, correspondant à la dimension d'une ou deux cellules (20–60  $\mu\text{m}$ ) [3].

Dans ce travail, nous proposons d'étudier la faisabilité de la micro-tomographie (micro-CT) synchrotron pour visualiser en 3D le système lacuno-canaliculaire. La principale difficulté provient des dimensions des canalicules, décrites comme des micro-canaux de diamètre compris entre 100 et 1000 nanomètres [4]. Grâce aux propriétés du rayonnement synchrotron, la micro-CT synchrotron permet d'atteindre des résolutions spatiales de l'ordre de quelques centaines de nanomètres [5] [6].

Toutefois, à cette échelle, la détection des canalicules est difficile à cause du rapport signal sur bruit limité et

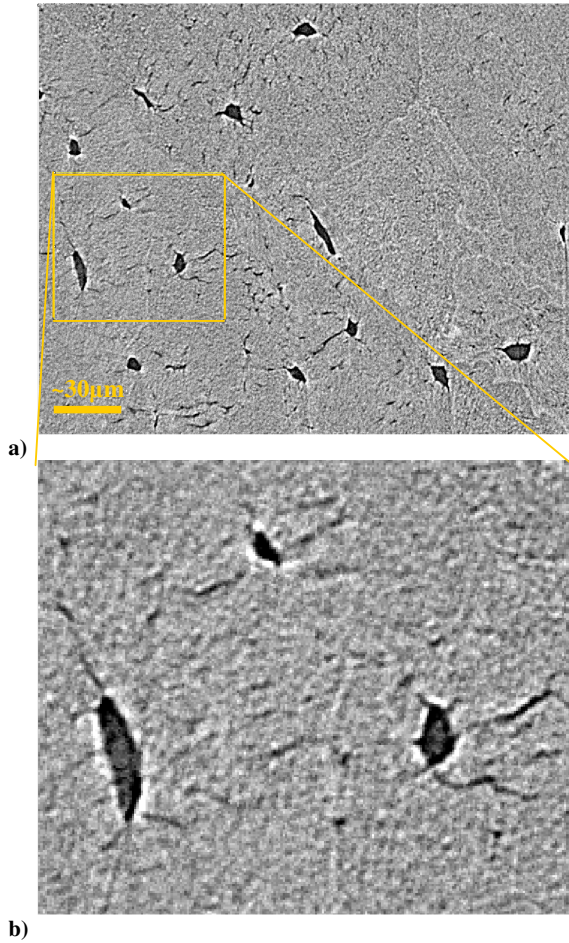
des effets de volume partiel. La détection des canalicules demande donc le développement de méthodes appropriées. Des problèmes similaires apparaissent par exemple en microscopie électronique pour la détection des microtubules cellulaires. Dans ce cas, une méthode de rehaussement basée sur les champs d'orientation a été récemment exposée [7].

Dans ce papier, nous présentons une méthode de filtrage non-linéaire 3D pour détecter le système lacuno-canaliculaire du tissu osseux. Nous montrons les premiers résultats de visualisation 3D du système lacuno-canaliculaire obtenus sur des données expérimentales.

## 2 Acquisition d'images

Les images 3D ont été acquises sur le système de micro-CT synchrotron de la ligne ID19 à ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), qui utilise une géométrie d'acquisition parallèle. Les projections 2D d'un échantillon en rotation autour d'un axe vertical ont été enregistrées sur un détecteur de 2048x2048 pixels [5]. La taille des pixels des projections et des voxels isotropes de l'image 3D reconstruite est de 0.28 $\mu\text{m}$ . Les coupes 2D des images 3D montrent que si les lacunes ostéocytaires sont clairement visibles, les canalicules ont un contraste relativement faible et sont fortement affectées par le bruit (cf **Figure 1**).

Les images présentées dans ce papier ont été acquises sur un échantillon d'os humain ostéoporotique provenant d'une biopsie de crête iliaque. Afin d'être adapté au champ de vue limité par la résolution, l'échantillon a été coupé, avec une perceuse d'haute précision, en forme de cylindre avec un diamètre de 500 $\mu\text{m}$ .



**Figure 1 : a) région d'intérêt dans une coupe reconstruite 2D ; b) Détail de la région représentée dans la Fig. 1.a) – la largeur de l'image est ~65µm**

L'acquisition a été réalisée avec un faisceau de rayons X monochromatique, d'énergie 18keV, 2000 projections et un temps d'exposition de 0.5 secondes par projection. La durée totale du scan est d'environ 30 minutes.

La figure **1a)** illustre une région d'intérêt dans une coupe 2D reconstruite qui est détaillée dans la figure **1b)** pour une meilleure observation de la qualité de l'image.

### 3 Analyse d'image

Nous présentons la méthode proposée afin de détecter le réseau lacuno-canaliculaire. Cette méthode exploite les connaissances physiologiques sur la géométrie des structures recherchées : fines structures tubulaires pour les canalicules, formes ellipsoïdales pour les lacunes ostéocytaires. Nous proposons un traitement en deux étapes, une étape destinée à détecter les structures filaires, suivie d'une étape de filtrage non-linéaire qui combine cette information avec l'image en niveaux de gris.

#### 3.1 Critère de tubularité

Des critères basés sur l'utilisation de la matrice hessienne ont été proposés pour détecter des vaisseaux dans des images médicales 3D [8,9,10]. Les valeurs

propres de la matrice hessienne permettent d'obtenir des informations sur la géométrie locale des structures. Les dérivées secondes étant très sensibles au bruit, l'image est généralement lissée avec un noyau gaussien d'écart-type  $\sigma$ . En combinant les opérations de lissage et de dérivation, il suffit de convoluer l'image avec un filtre approprié pour calculer les dérivées secondes.

L'analyse est réalisée pour chaque voxel  $\mathbf{x} = (x, y, z)$  de l'image 3D  $f(\mathbf{x})$ . Soient  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$  les valeurs propres de la matrice hessienne, classées par ordre croissant, calculées au point  $\mathbf{x}$ . Idéalement, si le voxel se trouve dans une structure tubulaire, on devrait avoir  $\lambda_1 \equiv 0$ ,  $|\lambda_1| \ll |\lambda_2|, |\lambda_2| \equiv |\lambda_3|$ . À partir des valeurs propres calculées pour chaque voxel, on peut donc définir un critère de tubularité. On obtient ainsi la carte 3D de ce critère que l'on notera  $v(\mathbf{x})$ . Sato [9] a défini un critère utilisant deux valeurs propres :

$$v(\mathbf{x}) = \begin{cases} \exp(-\lambda_1^2 / 2(\alpha_1 \lambda_c)^2) & \lambda_1 < 0, \lambda_c \neq 0 \\ 0 & \lambda_c = 0 \\ \exp(-\lambda_1^2 / 2(\alpha_2 \lambda_c)^2) & \lambda_1 < 0, \lambda_c \neq 0 \end{cases} \quad (1)$$

où  $\lambda_c = \min(-\lambda_2, -\lambda_3)$  et  $\alpha_1, \alpha_2$  sont des paramètres.

Frangi [10] a proposé un critère basé sur les trois valeurs propres, avec lesquels il définit des rapports mesurant une déviation par rapport à une forme sphérique ( $R_A$ ) ou à une plaque ( $R_B$ ) :

$$v(\mathbf{x}) = \begin{cases} 0 & \text{if } \lambda_2 > 0 \text{ or } \lambda_3 > 0 \\ (1 - \exp(-\frac{R_A^2}{2a^2})) \exp(\frac{R_B^2}{2b^2}) (1 - \exp(-\frac{S^2}{2c^2})) & \end{cases} \quad (2)$$

$$R_A = \frac{|\lambda_2|}{|\lambda_3|}, \quad R_B = \frac{|\lambda_1|}{\sqrt{|\lambda_2 \lambda_3|}} \quad \text{et} \quad S = \sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2} \quad (3)$$

et  $a, b, c$  sont des paramètres à régler [11].

#### 3.2 Filtrage non-linéaire

Les critères ci-dessus fournissent une mesure de similarité robuste pour les structures tubulaires. Toutefois, l'application à nos images a montré que cette mesure n'était pas suffisante pour extraire le système lacuno-canaliculaire. Le résultat étant dépendant de l'échelle, nous avons choisi un paramètre  $\sigma$  faible, adapté aux canalicules. Le choix d'une petite échelle conduit à l'élimination des lacunes qui en présence du bruit sont transformées en fausses agglomérations de structures tubulaires. Nous pouvons remarquer que la dynamique du critère n'est pas liée aux niveaux de gris d'origine et peut varier entre les échantillons. De plus, la méthode transforme le bruit de l'image tomographique en un bruit géométriquement structuré, qui rend la détection plus délicate.

Ainsi, nous proposons de combiner le critère de tubularité à un filtre non-linéaire appliqué à l'image originale. Au lieu de considérer un filtre linéaire

habituel, le filtre est adapté à chaque voxel et tient compte des valeurs du critère dans un voisinage. Si  $v(\mathbf{x})$  est le critère 3D calculé, nous définissons l'image  $f_{NL}(\mathbf{x})$  par :

$$f_{NL}(\mathbf{x}) = \frac{1}{Z} \sum_{\mathbf{x}' \in W_{\mathbf{x}}} f(\mathbf{x}') \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{v(\mathbf{x}) - v(\mathbf{x}')}{\sigma_w}\right)^2\right) \quad (3)$$

$$Z = \sum_{\mathbf{x}' \in W_{\mathbf{x}}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{v(\mathbf{x}) - v(\mathbf{x}')}{\sigma_w}\right)^2\right) \quad (4)$$

où  $W_{\mathbf{x}}$  est un voisinage de  $\mathbf{x}$ , et  $\sigma_w$  est l'écart type d'une gaussienne permettant d'ajuster la sélectivité du filtre.

#### 4 Résultats

Pour tester la méthode proposée nous avons créé un fantôme 3D simulant les lacunes reliées par les canalicules. Les canalicules sont modélisées par des cylindres de diamètre de un ou deux voxels, conformément aux dimensions observées dans les images expérimentales. Nous avons ajouté un bruit Gaussien avec un écart type de 25, valeur également estimée à partir des images expérimentales.

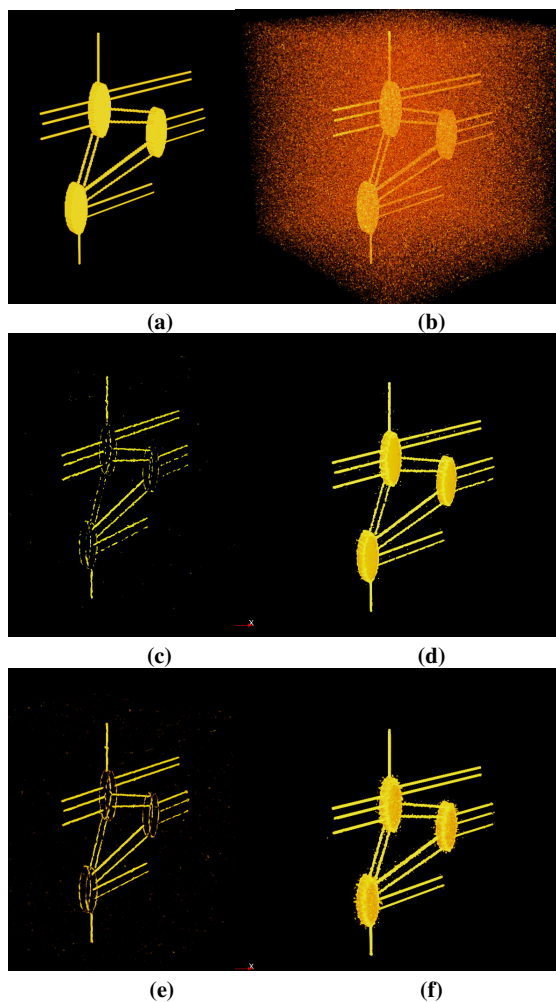


Figure 2 : a) fantôme original ; b) fantôme bruité; c) critère de Frangi sur le fantôme bruité ; d) critère de Frangi et filtrage non-linéaire proposé dans cet article ; e) critère de Sato sur le fantôme bruité ; f) critère de Sato et filtrage non-linéaire

Les figures 2c) et 2e) illustrent respectivement des rendus 3D obtenus avec les critères de Frangi et Sato. Les images 2d) et 2f) montrent respectivement les résultats après l'application du filtrage non-linéaire sur les critères de Frangi et Sato.

Les paramètres pour les critères de Sato et Frangi ont été choisis après une série de tests expérimentaux [11]. Dans l'équation (1) nous avons utilisé  $\alpha_1 = 0.5$ ,  $\alpha_2 = 2$ , alors que pour l'équation (2) nous avons choisi  $a = 0.5$ ,  $b = 0.5$ ,  $c = 5$ . Dans les résultats, on observe que le filtre de Frangi élimine efficacement le bruit mais une partie de l'information utile est perdue, tandis que celui de Sato restitue mieux la structure d'intérêt mais conserve quelques résidus de bruit

On remarque que le filtrage non-linéaire améliore nettement la détection des structures tubulaires tout en récupérant les structures ellipsoïdales.

Nous montrons dans la suite des résultats obtenus à partir d'images expérimentales.

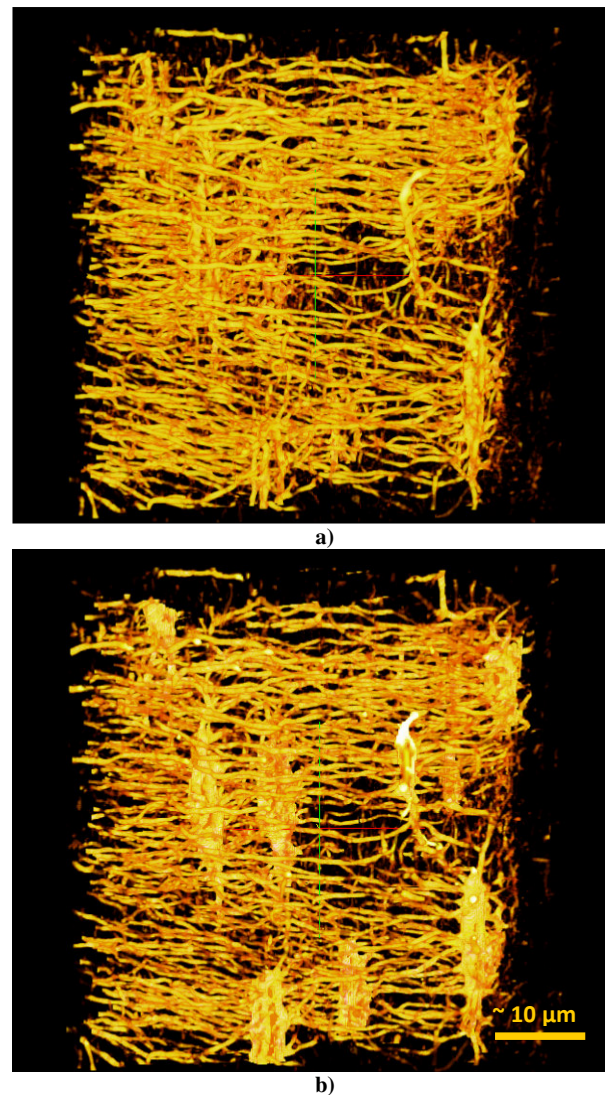
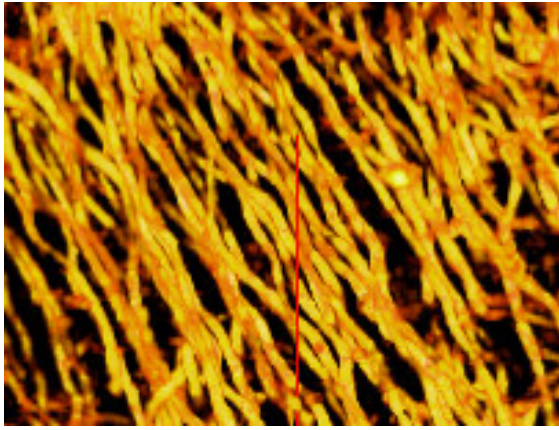


Figure 3 : Sous-volume montrant le système lacuno-canaliculaire dans un échantillon d'os humain ostéoporotique (la largeur de l'image  $\sim 72\mu\text{m}$ ): a) après filtrage Frangi ; b) après filtrage Frangi et filtrage non-linéaire ;



**Figure 4 :** Détail d'une image obtenue après le filtrage non-linéaire utilisant le critère de Sato ;

Un sous-volume  $(256)^3$  correspondant à un cube d'environ  $72\mu\text{m}$  de côté a été utilisé dans les images **3a)** et **3b)**. Pour le traitement des volumes expérimentales nous avons utilisé les mêmes paramètres que pour les volumes simulées.

L'observation détaillée des figures **3a)** et **3b)** montre qu'après le filtrage non-linéaire, les effets du bruit sont réduits et les lacunes ostéocytaires sont de nouveau visibles.

La **Figure 4** illustre une région détaillée d'une image filtrée non-linéaire à partir du critère de Sato. On peut observer que même si le bruit n'est pas complètement éliminé, l'intégrité des canalicules est assez bien restituée.

## 5 Conclusion

Au niveau cellulaire, la plupart des structures biologiques ne sont étudiées que sur des sections bidimensionnelles. Nous avons montré la faisabilité de la micro-CT à une échelle nanométrique pour étudier le système ostéocytaire du tissu osseux en 3D. Contrairement à la microscopie confocale, les images micro-CT ont une résolution spatiale isotrope. Toutefois afin d'obtenir des données quantitatives et compte tenu du rapport signal sur bruit limité à cette échelle, il est nécessaire de développer des méthodes d'analyse spécifiques. Dans cet article, nous avons proposé une adaptation de la méthode de Frangi-Sato pour améliorer la détection du système lacuno-canaliculaire. Les images présentées sont les premiers rendus 3D de telles microstructures et montrent la complexité de ce réseau.

## 6 Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier le groupe de la ligne ID19 d'ESRF pour l'aide pendant l'acquisition données et le Prof. MH Lafage-Proust (Inserm U890, St-Etienne, France) qui a fourni l'échantillon osseux.

## 7 Références

- [1] M.L. Knothe Tate, J.R. Adamson, A.E. Tami, T.W. Bauer, "The osteocyte", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 : 1-8, 2004.
- [2] M.L. Knothe Tate, T.W. Bauer, A.E.G. Tami, U. Knothe, "Micropathoanatomy of osteoporosis: indications for a cellular basis of bone disease", *Advances in Osteoporotic Fracture Management*, Vol. 2 : 9-14, 2002.
- [3] A. Vatsa, R.G. Breuls, C.M. Semeins, P.L. Salmon, T.H. Smit, and J. Klein-Nulend, "Osteocyte morphology in fibula and calvaria — Is there a role for mechanosensing?," *Bone*, vol. 43, pp. 452-458, Sep. 2008.
- [4] G.C. Reilly, H.F. Knapp, A. Stemmer, P. Niederer, M.L. Knothe Tate, "Investigation of the morphology of the Lacunocanalicular system of Cortical Bone Using Atomic Force Microscopy", *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 29 : 1074-1081, 2001.
- [5] M. Salome, F. Peyrin, P. Cloetens, C. Odet, A.M. Laval-Jeantet, J Baruchel, P Spanne, "A synchrotron radiation microtomography system for the analysis of trabecular bone samples", *Med. Phys.*, 26 : 2194-2204, 1999.
- [6] Peyrin F., Salome M., Cloetens P., Laval-Jeantet A.M., Ritman E., Rügsegger P., "Micro-CT examinations of trabecular bone samples at different resolutions : 14, 7 and 2 micron level", *Technology and Health Care*, IOS Press, 6(5-6) : 391-401, 1998.
- [7] Sandberg K., Brega M., "Segmentation of thin structures in electron micrographs using orientation fields", *Journal of Structural Biology*, 157 : 403-415, 2007
- [8] C. Lorenz, I-C. Carlsen, T. M. Buzug, C. Fassnacht, J. Weese. Multi-scale line segmentation with automatic estimation of width, contrast and tangential direction in 2D and 3D medical images. *Proc. CVRMed-MRCAS'97*, LNCS, 233-242, 1997.
- [9] Y. Sato, S. Nakajima, N. Shiraga, H. Atsumi, S. Yoshida, T. Koller, G. Gerig, R. Kikinis, "Three-Dimensional Multi-Scale Line Filter for Segmentation and Visualization of Curvilinear Structures in Medical Images", *Medical Image Analysis*, 2(2) : 143-168, 1998.
- [10] A.F. Frangi, W.J. Niessen, K.L. Vincken, M.A. Viergever, "Multiscale Vessel Enhancement Filtering", *Lect. Notes. Comput. Sci.*, 1496 : 130-137, 1998.
- [11] S.D. Olabbarriaga, M. Breeuwer, W.J. Niessen, "Evaluation of Hessian-based filters to enhance the axis of coronary arteries in CT images", *International Congress Series*, 1256 : 1191-1196, 2003.