

Validation Expérimentale d'une Chaîne de Traitement d'Images de Bioluminescence chez le Petit Animal

SMAIL AKKOUL¹, ROGER LEDEE¹, RÉMY LECONGE¹, RACHID HARBA¹
SABRINA PESNEL², STEPHANIE LERONDEL², ALAIN LEPAPE²

¹ Institut PRISME, équipe projet ISS

12 rue de Blois, BP 6744, 45067 Orléans Cedex 2, France

² CDTA - Centre de Distribution, Typage et Archivage animal

3 B, rue de la Férollerie, 45071 Orléans Cedex 2

¹smail.akkoul@univ-orleans.fr, roger.ledee@univ-orleans.fr, remy.leconge@univ-orleans.fr,
rachid.harba@univ-orleans.fr,

²sabrina.pesnel@cnrs-orleans.fr, lerondel@cnrs-orleans.fr, lepape@cnrs-orleans.fr

Résumé - L'imagerie de bioluminescence est une modalité qui permet à la fois d'avoir une information métabolique et fonctionnelle. Elle est appliquée par exemple au modèle animal pour l'étude de maladies ou la mise au point de certains traitements. Dans ce travail, nous proposons une chaîne de traitement en imagerie de bioluminescence et sa validation. Cette chaîne est composée d'un filtrage médian type SWM (SWitching Median) pour éliminer le bruit impulsionnel et d'une étape de restauration pour éliminer le flou inhérent à ce type d'application (restauration aveugle par maximum de vraisemblance avec modèle poissonien). Cette chaîne est validée par comparaison avec la réalité terrain. Les résultats indiquent que l'erreur relative sur les mesures de surfaces de tumeurs passe de 100% à 4,27%, ce qui montre l'efficacité des traitements proposés.

Abstract - The bioluminescence imaging is a modality that allows having both metabolic and functional information. For example, it is applied for the animal models to study the diseases or the development of some treatments. In this work, we propose the validation of a processing chain applied to the bioluminescence images. This chain consists of a SWM (SWitching median) filtering to eliminate the impulsive noise and from a restoration step to eliminate the blur related to this type of application (blind restoration using maximum likelihood with poissonien model). The chain is validated by comparing with a ground truth. Results show that the measurement relative error of the tumor surface decreases from 100 % to 4.27 %. It clearly demonstrates the efficiency of the proposed method.

1 Introduction

En 2003, il a été montré que 80% du génome humain est identique à celui des rongeurs. Aujourd'hui, les souris génétiquement modifiées constituent de formidables modèles de maladies humaines pour la recherche biologique, la recherche biomédicale et pour la mise au point de nouveaux médicaments.

Les stratégies de recherche dans ces domaines ont débouché sur l'émergence de nouvelles modalités d'imagerie comme l'imagerie de bioluminescence. La bioluminescence est une émission de lumière chez des organismes vivants. Elle est due à l'émission de photons par une molécule organique (la luciférine) excitée à la suite d'une réaction d'oxydation catalysée par une enzyme (la luciférase). L'imagerie de bioluminescence offre la possibilité d'imager l'expression du gène de la luciférase de façon non invasive et ainsi d'être exploitée dans le suivi et la localisation de l'activité biologique au cours du temps, dans la visualisation de tumeurs, pour la détection de métastases, ou encore lors de suivis thérapeutiques. Par exemple, pour étudier l'évolution d'un type de cancer, on implante des cellules tumorales porteuses du gène de la luciférase à des souris et au

moment de procéder à une acquisition d'images, on leur injecte de la luciférine. Seules les cellules tumorales émettront de la lumière car porteuses du gène de la luciférase. Néanmoins, la lumière émise est faible voire très faible et subit des phénomènes de diffusion et d'absorption dans les tissus. Ce qui va induire un flou dans les images résultantes. Du fait que le système d'acquisition est très sensible au phénomène observé, il est aussi sensible au bruit impulsionnel lié au rayonnement cosmique.

Des études ont montré que, pour des tumeurs de petite taille (Diamètre < 10 mm) comme celles que nous étudions, le rayonnement volumique est homogène [1-2]. Il peut donc être envisagé de procéder à des mesures dimensionnelles sur les images de bioluminescence qui par nature est une imagerie moléculaire. Il est donc nécessaire de traiter ces images pour palier aux phénomènes intervenant lors de l'acquisition.

A notre connaissance, aucune chaîne de traitement d'images spécifique n'a été proposée pour analyser ce type d'images. Après une analyse du processus d'acquisition, nous proposerons un modèle de formation de ces images et une chaîne de traitement comportant un

filtre permettant de supprimer le bruit impulsionnel et une étape de déconvolution pour palier au problème du flou. Puis nous validerons expérimentalement cette chaîne par des mesures in vivo chez un lot de souris.

Dans cette communication, après avoir présenté le matériel, le modèle de formation des images et les méthodes utilisées dans la chaîne de traitement, les résultats expérimentaux seront exposés.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Matériel

Pour l'expérimentation animale, nous disposons de sept souris femelles de race Swiss Nude. A l'âge de douze semaines, des cellules tumorales (U87-Luc) leur ont été implantées au niveau du flanc droit. Les images de bioluminescence ont été réalisées 1 mois plus tard. Le protocole d'acquisition est le suivant : la souris est endormie par anesthésie chimique (Kétamine-Xylazine) puis la luciférine est injectée en IP (Intra Péritonéale) (2mg/100µL). Dix minutes après, l'acquisition de l'image de bioluminescence est effectuée avec une durée d'exposition de 20 secondes.

Les images de bioluminescence sont acquises avec le système de la société Hamamatsu (Macroscopic Imaging AEQUORIA system). Il est composé d'un boîtier hermétique équipé d'une camera CCD refroidie à -70°C travaillant dans la gamme spectrale de la luciférine in vivo. Ce refroidissement est nécessaire pour atténuer fortement les bruits liés à l'instrumentation et être ainsi sensible au phénomène de bioluminescence. Les images obtenues ont une résolution de 512x512 pixels codés sur 16 bits. La résolution spatiale isotrope est de 300 µm.

2.2 Modèle de formation des images de bioluminescence

Le rayonnement photonique issu du phénomène de bioluminescence se propage dans toutes les directions et est capté par la caméra CCD après avoir traversé une partie des chairs et la peau de l'animal. Il subit donc des phénomènes de diffusion et d'absorption. De plus, un bruit impulsionnel lié au rayonnement cosmique est présent. De part le faible nombre de photons reçu, ce type d'imagerie s'apparente à celui rencontré en astronomie ou en microscopie optique [5-8]. Un modèle poissonien est donc adopté pour rendre compte de la formation de l'image :

$$I(x, y) = p([O(x, y) * h(x, y)]) + b(x, y), \quad (1)$$

avec I : image acquise, O : image source, h : réponse impulsionnelle du système ou PSF (Point Spread Function), * : produit de convolution, p : est le processus poissonien, b : bruit impulsionnel dû au rayonnement cosmique.

Afin de retrouver l'image source, il faut donc effectuer un filtrage du bruit impulsionnel et une

déconvolution adaptée à l'effet poissonien sachant que seule une estimation de la PSF est accessible.

2.3 Chaîne de traitement adaptée à l'imagerie de bioluminescence

Pour l'étude du filtre et la comparaison des méthodes de restauration, nous avons tout d'abord généré des images de synthèse à partir du modèle de formation des images de bioluminescence (eq. 1). Nous avons estimée ensuite la PSF sur le système d'acquisition en créant une source ponctuelle constituée d'une fibre optique de 200 µm (pour être inférieure à la taille du pixel qui est de 300 µm). Placée sous la peau d'une souris, elle est reliée à un générateur de lumière filtrée, ceci pour être dans la gamme spectrale d'émission de la luciférine. Ces images de synthèse ont permis de tester les méthodes exposées par la suite et de choisir la plus performante.

2.3.1 Etape de filtrage

Le bruit lié au rayonnement cosmique est considéré comme un bruit impulsionnel. Le type de filtre adapté à ce type de bruit est le filtre médian [3]. Mais, ce dernier peut modifier le pixel central d'une fenêtre d'observation même si aucun bruit impulsionnel n'est présent. Pour remédier à ce problème, le Switching Median Filter (SWM) a été proposé par Sun et Neuvo en 1994 [9]. Le SWM détecte si le pixel central de la fenêtre considéré est bruité ou pas en comparant la différence de ce pixel central avec la valeur médiane de la fenêtre à un seuil prédéfini. Si oui, le pixel est remplacé par la valeur médiane. La sortie du filtre s'exprime comme :

$$Y_{i,j} = \begin{cases} m_{i,j}, & \text{if } |m_{i,j} - X_{i,j}| > \text{Seuil}, \\ X_{i,j}, & \text{si non} \end{cases} \quad (2)$$

où $m_{i,j}$ est la valeur médiane et $X_{i,j}$ la valeur du pixel central de la fenêtre, $Y_{i,j}$ la sortie du filtre.

Pour notre application, c'est ce filtre que nous avons mis en œuvre en choisissant un seuil adapté à nos images comme proposé par [10]. Ce choix est basé sur l'étude de l'évolution du MSE (Mean Square Error) en fonction du seuil sur des images tests.

2.3.2 Etape de déconvolution

Concernant le traitement du flou, nous avons comparé neuf méthodes de restauration. Nous avons classé ces méthodes en quatre classes : linéaires, non linéaires, statistiques et aveugles [4]. Enfin, pour la comparaison des méthodes entre elles, nous avons tout d'abord exploité le critère classique qu'est le MSE. Il en est ressorti que les méthodes statistiques et aveugles donnaient des résultats équivalents. Nous avons alors proposé d'utiliser le critère défini en [5] pour l'imagerie de médecine nucléaire. Ce critère nécessite de définir une région d'intérêt de l'image dans laquelle on calcule la moyenne et l'écart type. Ce critère a permis de montrer que la déconvolution aveugle, initialisée par la PSF expérimentale, est la mieux adaptée à l'imagerie de

bioluminescence car présentant le moins d'oscillations dans la zone définie et une valeur moyenne de l'intensité dans cette zone proche de l'intensité réelle. Ce résultat est corroboré par des études menées en imagerie astronomique [6] et de fluorescence [7-8].

La méthode du maximum de vraisemblance est mise en œuvre pour effectuer la déconvolution aveugle. Nous rappelons dans ce qui suit, que pour un modèle poissonien, la fonction de vraisemblance de l'image observée I conditionnelle à l'image source O s'écrit :

$$p(I/O) = \prod_{x,y} \frac{[(h * O)(x, y)]^{I(x,y)} \exp\{- (h * O)(x, y)\}}{I(x, y)!}. \quad (3)$$

Le maximum est ensuite obtenu en annulant la dérivée du logarithme de $p(I/O)$ par rapport à O :

$$\frac{\partial \ln p(I/O)(x, y)}{\partial O(x, y)} = 0. \quad (4)$$

En normalisant la réponse impulsionnelle et en utilisant les itérations de Picard, on obtient une formule itérative qui est aussi appelée algorithme de Richardson-Lucy [6] :

$$O_{n+1}(x, y) = \left[\frac{I(x, y)}{(h_n * O_n)(x, y)} * h(-x, -y) \right] \cdot O_n(x, y). \quad (5)$$

La réponse impulsionnelle h est elle aussi estimée de manière itérative :

$$h_{n+1}(x, y) = \left[\frac{I(x, y)}{(h_n * O_n)(x, y)} * O_n(-x, -y) \right] \cdot h_n(x, y), \quad (6)$$

où $O_{n+1}(x, y)$ et $h_{n+1}(x, y)$ sont respectivement l'image et la réponse impulsionnelle obtenues à la $(n+1)$ ème itération, $h(-x, -y)$ et $O(-x, -y)$ sont respectivement les transposées de $h(x, y)$ et $O(x, y)$.

Lorsque la différence relative entre deux itérations est inférieure à un seuil ε , le processus itératif est stoppé. Nous avons choisi $\varepsilon = 10^{-4}$ et cette condition s'écrit de la manière suivante :

$$\frac{\sum_{x,y} |O_{n+1}(x, y) - O_n(x, y)|}{\sum_{x,y} O_n(x, y)} < \varepsilon. \quad (7)$$

3 Résultats

Les figures 1a et 1b montrent un exemple d'image de bioluminescence sur laquelle on distingue le signal utile et le bruit impulsionnel.

Les figures 1c et 1d montrent cette même image après filtrage médian : 1c avec le filtre médian classique et 1d avec le filtre de type SWM. Avec le filtrage médian classique, on constate qu'il reste un certain nombre d'impulsions, ce qui n'est plus le cas avec le filtre de type SWM. Ce résultat se confirme sur les autres images

disponibles. Nous choisissons donc ce type de filtre comme première étape de notre chaîne de traitement.

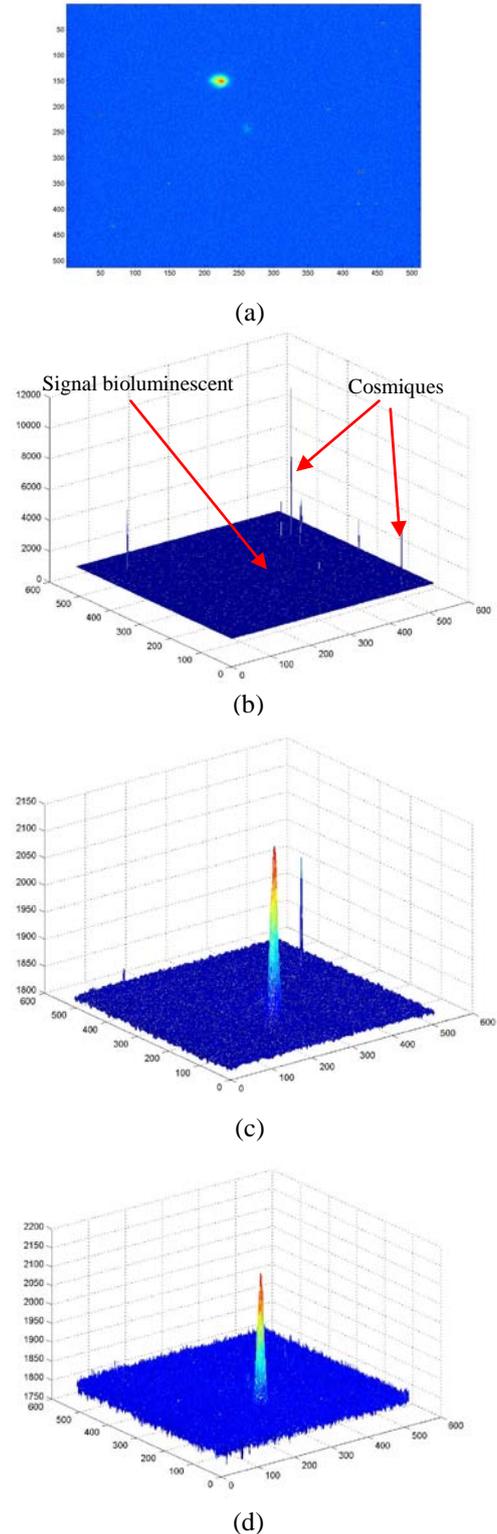


Figure 1 : (a) Exemple d'image de bioluminescence en fausses couleurs, (b) représentation de la même image sous forme d'intensités (c) même image après filtrage médian standard (d) même image après filtrage médian type SWM

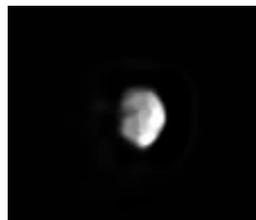
Dans une étude précédente [4], nous avons montré que la restauration aveugle était la mieux adaptée à nos images. Un résultat de cette restauration qui constitue la deuxième étape de notre chaîne est présenté en figure 2.b. La figure 2.a est l'image originale acquise.

Pour valider cette chaîne, nous avons confronté nos résultats à la réalité terrain. Après incision et mise en

évidence de la tumeur, des images macro (en lumière visible) sont réalisées de manière à mesurer avec précision la taille des tumeurs. Un exemple est montré figure 2.c. Ces images sont réalisées grâce à un reflex numérique de 10Mpx (3888 x 2592), équipé d'un objectif standard 18-200 mm réglé sur 150 mm auquel 60 mm de bague allonge ont été ajoutés afin d'augmenter le tirage de l'objectif d'origine. Ce système d'acquisition fournit des images de tumeurs de très bonne résolution (pixel de 7 μ m de côté) ce qui permet de mesurer précisément leurs dimensions. Les tumeurs vues en bioluminescence et celles en imagerie visible ont été segmentées manuellement par un expert.



(a)



(b)



(c)

Figure 2 : (a) Image de bioluminescence d'une tumeur en niveau de gris, (b) Image après filtrage et restauration, (c) Image visible de cette même tumeur

Tab 1 : Mesures des surfaces (mm²) : A₁ sur images macro, A₂ et A₃ sur images de bioluminescence avant et après restauration respectivement. Erreurs relatives (en %) Err₁ et Err₂: avant et après restauration.

N° Souris	1	2	3	4	5	6	7
A ₁	50,94	25,79	50,71	17,76	41,85	57,32	9,72
A ₂	95,58	62,01	95,4	38,25	74,43	88,29	24,75
A ₃	53,13	27,72	52,02	18,36	40,5	54,81	9,75
Err ₁ (%)	87	140	88	115	77	54	142
Err ₂ (%)	4,4	7,4	2,5	3,3	3,2	4,3	4,8

Les résultats obtenus (Tab. 1) montrent que sur les 7 souris incluses dans cette étude, l'erreur relative moyenne sur la mesure de la surface des tumeurs (bioluminescence comparée à la référence en lumière visible; $|A_2 \text{ ou } A_3 - A_1|/A_1$) passe de quasi 100% à de 4.27%. Ce résultat confirme l'intérêt de la chaîne de traitement.

Il valide aussi l'hypothèse que les tumeurs de surfaces inférieures au centimètre carré rayonnent uniformément et que l'imagerie de bioluminescence est un bon moyen de connaître et de suivre l'évolution de ces tumeurs in-vivo.

4 Conclusion

Dans ce travail, nous avons proposé et validé une chaîne de traitement d'images de bioluminescence. Pour cela, après avoir modélisé la formation de ces nouvelles images, une chaîne composée d'une étape de filtrage suivie d'une étape de déconvolution ont été mise en œuvre. Les résultats des mesures obtenues comparés aux mesures sur des images macroscopiques montrent tout l'intérêt de la mise en place de cette chaîne.

5 Bibliographie

- [1] C.C Chen, J.J Hwang, and al, "Monitoring and quantitative assessment of tumor burden using in vivo bioluminescence imaging," Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, vol. 571, issues 1-2, pp. 437-441, 2007.
- [2] K.R. Zinn, T.R. Chaudhuri, and al, "Noninvasive bioluminescence imaging in small animals," Institute for Laboratory Animal Research Journal, vol. 49, n° 1, pp. 103-115, 2008.
- [3] R.C. Gonzalez, and R.E. Woods, "Digital image processing," Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 2002.
- [4] S. Akkoul, R. Lédée, and al, "Comparison of image restoration methods for bioluminescence imaging," ICISP 08, Cherbourg, France, Electronic Publication in Image & Signal Processing of Lecture Notes in Computer Science, LNCS 5099, pp. 163-172, 2008.
- [5] M. Mignotte, J. Meunier, "Three-Dimensional Blind Deconvolution of SPECT Images," IEEE Transactions on Biomedical Engineering, Vol. 47, n°2, pp. 274-280, 2000.
- [6] J-L. Starck, E. Pantin and F. Murtagh, "Deconvolution in Astronomy: a Review", Publication of the Astronomical Society of the Pacific, Vol. 114, pp 1051-1069, 2002.
- [7] P. Sarder, A. Nehorai, "Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images," Signal Processing Magazine, IEEE, Vol. 23, No. 3pp. 32-45, 2006.
- [8] P. Pankajakshan, L. Blanc-Féraud, and al, "Parametric Blind Deconvolution for Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)-Proof of Concept." Rapport de Recherche 6493, INRIA, avril 2008.
- [9] T. Sun, and Y. Neuvo, "Detail preserving median based filters in image processing," Pattern Recognition Letters, vol. 15, pp. 341-347, 1994.
- [10] T. Chen, K.K. Ma, and L.H. Chen, "Tri-state median filter for image denoising," IEEE Trans. Image Processing, vol. 8, pp. 1834-1838, Dec. 1999.