

# Application de la Factorisation en Matrices Non-négatives pour l'amélioration de la localisation de tumeurs en tomographie optique diffuse de fluorescence

Anne-Sophie MONTCUQUET<sup>1</sup>, Lionel HERVÉ<sup>1</sup>, Fabrice NAVARRO<sup>1</sup>, Jean-Marc DINTEN<sup>1</sup>, Jérôme I. MARS<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>GIPSA-Lab, Département Images-Signal, Rue de la houille blanche BP46, 38402 Saint Martin d'Hères, France  
as.montcuquet@gmail.com, jerome.mars@gipsa-lab.grenoble-inp.fr

**Résumé** – L'imagerie optique de fluorescence permet de localiser des marqueurs fluorescents spécifiques injectés au patient qui s'accumulent autour de tumeurs cancéreuses. Une fois les régions d'intérêt illuminées, un signal de fluorescence est émis par les marqueurs mais également par les tissus sains environnants. Lors de l'analyse de tissus épais, alors que le signal de fluorescence décroît avec le parcours de la lumière, l'autofluorescence des tissus prévient la détection des marqueurs profonds. Une approche spectroscopique basée sur la Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN) est proposée pour séparer les spectres de fluorescence et éliminer l'autofluorescence des tissus. Afin de limiter le problème de non-unicité de la décomposition, l'ajout d'*a priori* à la méthode classique développée par Lee et Seung est proposé; la pertinence de ces contraintes est illustrée sur des exemples d'acquisitions de fluorescence *in vivo*.

**Abstract** – Fluorescence imaging locates injected fluorescent markers that specifically bind to tumors. Once regions of interest are illuminated, fluorescence is emitted back from fluorescent markers, as well as from biological tissues. For thick media analysis, as the fluorescence signal decreases with the light travel distance, autofluorescence of tissues comes to be a disruption to tumor detection. A spectroscopic approach, based on Non-negative Matrix Factorization (NMF), is explored to unmix fluorescence spectra and remove autofluorescence of tissues. In order to limit non-uniqueness ambiguities, prior information is added to the classical NMF method developed by Lee and Seung; relevance of these new constraints is validated on *in vivo* fluorescence acquisitions examples.

## 1 Introduction

L'imagerie optique de fluorescence utilise des marqueurs fluorescents spécifiques injectés à un patient pour marquer des tumeurs [1]. La région d'intérêt est illuminée par une source à une longueur d'onde choisie dans le rouge et proche infrarouge (600-900 nm) optimale pour limiter l'absorption de la lumière et traverser plusieurs centimètres de tissus biologiques. Enfin, la mesure de la fluorescence réémise par les marqueurs permet de localiser précisément la tumeur.

Cependant les tissus émettent également naturellement un signal fluorescent appelé autofluorescence. Dans notre configuration de géométrie de réflexion, le signal de fluorescence d'intérêt émis par les marqueurs décroît de façon exponentielle avec la profondeur de tissus traversée; le signal d'autofluorescence devient rapidement gênant dans l'exploration de tissus épais, compromet la localisation de la tumeur, et doit alors être éliminé. Nous proposons une méthode de séparation de spectres par Factorisation en Matrices Non-négatives (FMN), particulièrement bien adaptée à la spectroscopie de par sa contrainte de positivité intrinsèque, pour discriminer l'autofluorescence des tissus de la fluorescence émise par les marqueurs autour de la tumeur.

Comme dans tout problème de séparation de source aveugle,

la non-unicité de la décomposition requiert l'ajout d'information *a priori*. Nous proposons plusieurs régularisations permettant de restreindre l'ensemble de solutions au problème et de repousser les limites de détection de plusieurs millimètres. Enfin nous avons validé la méthode sur données réelles acquises *in vivo* sur petit animal.

## 2 Factorisation en Matrices Non-négatives

La définition classique de la FMN est la suivante[2] :

où des matrices non-négatives sont des matrices dont tous les coefficients sont supérieurs ou égaux à 0, et  $P$  représente le nombre de sources à séparer. Étant donnée une matrice non-négative  $V \in R^{N_s \times N_\lambda}$ , trouver deux matrices non-négatives  $A \in R^{N_s \times P}$  et  $S \in R^{P \times N_\lambda}$  telles que :

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

où des matrices non-négatives sont des matrices dont tous les coefficients sont supérieurs ou égaux à 0, et  $P$  représente le nombre de sources à séparer.

Appliqué à la spectroscopie, la matrice  $A$  est une matrice de poids, et  $S$  une matrice de spectres ; les deux matrices contiennent autant d'éléments  $P$  que de sources à séparer. Afin de déterminer deux matrices  $A$  et  $S$  candidates, la fonction de coût  $F$  suivante est minimisée :

$$F = \|V - AS\|_2^2 \quad (2)$$

Nous avons choisi de minimiser  $F$  itérativement par les mises à jour multiplicatives développées par Lee et Seung [2]. Ces lois ont l'avantage après initialisation des matrices  $A$  et  $S$  par des données non-négatives, de conserver la non-négativité au cours des itérations, mais également d'être très simples à implémenter, et à modifier lors d'ajouts de nouvelles contraintes au problème :

$$S \leftarrow S \frac{(A^t V)}{(A^t A S)}, \quad \text{et} \quad A \leftarrow A \frac{(V S^t)}{(A S S^t)} \quad (3)$$

## 2.1 Régularisation

**Non-unicité de la solution** Considérons une factorisation particulière des données  $V$  par le produit de deux matrices  $A$  et  $S$ . Il est alors facile de déterminer une matrice  $T$  inversible et dès lors de trouver un nouveau couple solution  $(\tilde{A}, \tilde{S})$  à notre problème :

$$V = (AT^{-1})(TS) = \tilde{A}\tilde{S} \quad (4)$$

Sans information *a priori* sur les sources et le mélange, la décomposition par FMN de  $V$  retourne une infinité de solutions. La contrainte de non-négativité permet d'ores et déjà de restreindre l'ensemble de solutions admissibles, mais d'autres contraintes peuvent être considérées pour améliorer la séparation [3, 4].

**Initialisation** L'influence de l'initialisation des matrices  $A$  et  $S$  a été étudiée sur simulations et données réelles, et une étape dite de départ à initialisations multiples a été ajoutée à l'algorithme classique [5]. Cette étape consiste à tester plusieurs initialisations (par exemple en testant plusieurs formes de spectres à différentes longueurs d'onde d'émission pour  $S$ ) sur très peu d'itérations ; les initialisations qui permettent d'obtenir la valeur minimale de la fonction de coût  $F$  sont considérées comme les mieux adaptées pour poursuivre l'étape d'optimisation [3]. Sur simulations de données du sein, l'utilisation de cette initialisation multiple a permis de repousser les limites de détection de plusieurs centimètres [5]. Un exemple est donné dans la partie "études sur simulations".

**Parcimonie spatiale** Nous nous sommes aussi intéressés à une contrainte supplémentaire dite de parcimonie spatiale. Nous cherchons dans la matrice de poids  $A$  à obtenir des colonnes de poids relatives aux marqueurs fluorescents parcimonieuses (soit avec peu de coefficients non-nuls) puisque les marqueurs sont concentrés localement dans le milieu autour des tumeurs. Le schéma 1 décrit ce principe : une séparation

parfaite des sources est caractérisée par une élimination totale du fond autofluorescent, et donc par un signal spatialement parcimonieux.

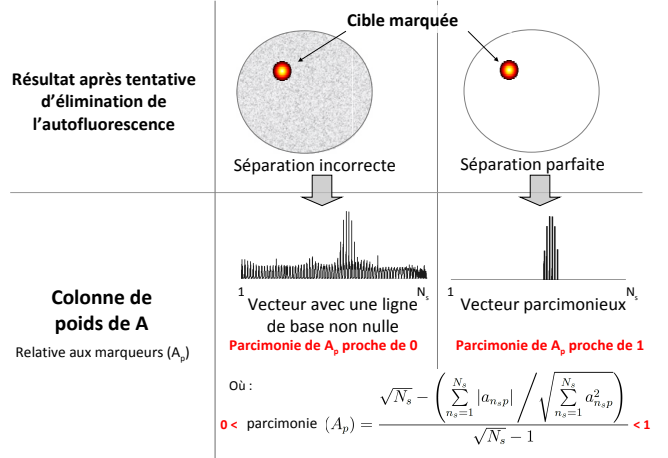


FIGURE 1 – La distribution très localisée des marqueurs dans le milieu se traduit par des vecteurs de poids associés parcimonieux.

L'algorithme présenté figure 2 propose d'ajouter une étape dédiée à la recherche de marqueurs répartis de façon parcimonieuse dans le milieu, pour une valeur  $\varphi$  de parcimonie imposée au départ [6]. L'algorithme agrémenté de cette étape de seuillage favorise les solutions spatialement parcimonieuses au cours des itérations. Il a été prouvé en simulation, et observé sur données réelles que cette contrainte supplémentaire, à condition que les signaux recherchés soient effectivement spatialement parcimonieux, permettait d'améliorer la séparation des spectres et par conséquent la détection des tumeurs. De même que pour la contrainte sur l'initialisation, dans la partie "études sur simulations" est proposé un exemple de l'intérêt de ce nouvel algorithme avec contraintes de parcimonie.

## 3 Études sur simulations

Comme présenté précédemment, l'information *a priori* est utile pour améliorer la séparation obtenue par FMN, et nous avons étudié plusieurs ajouts de contraintes à l'algorithme classique de FMN sur simulations de données du sein [7]. Pour cela une simulation d'une tumeur fluorescente dans un fond de tissus autofluorescent a été mise en place (voir figure 3). Lors de cette simulation, la tumeur est déplacée en profondeur dans les tissus autofluorescents, et le contraste tumeur-tissu sain est calculé pour chaque profondeur :  $C_{T,N} = \frac{T-\bar{N}}{T+\bar{N}}$  ( $\bar{T}$  et  $\bar{N}$  sont respectivement les intensités moyennes en photons par pixel des zones tumorale  $T$  et saine  $N$ ). Plus le contraste obtenu est proche de 1, plus la détection est bonne.

L'étape d'initialisation à départs multiples a été testée en utilisant comme gamme d'initialisations des translations des spectres de référence choisis. Cette étape permet de sélectionner une initialisation favorable à la décomposition par FMN,

### Nouvel Algorithme: FMN parcimonie

1. Initialisation (A,S)>0 à départs multiples  
+ choix d'une valeur initiale de parcimonie  $\varphi$
2. Minimisation de F : Mises à jour multiplicatives

```

for i = 1 : N_iter
    ◦  $A \leftarrow A \times \frac{VS^t}{ASS^t}$ 
    ◦  $S \leftarrow S \times \frac{A^tV}{A^tAS}$ 
    ◦ Seuillage sur  $A_p$ 
        
$$\tilde{a}_{xp} = \begin{cases} a_{xp} & \text{si } a_{xp} \geq \frac{\max(a_{xp})}{\beta_{pmin}} \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

        avec  $\beta_{pmin}$  la valeur de seuillage telle que:
        
$$\beta_{pmin} = \operatorname{argmin}_{\beta_p} \left| \operatorname{sparsity}(\tilde{A}_p(\beta_p)) - \varphi \right|$$

    ◦ If i = N_iter : Mise à jour de A et S
end
    
```

FIGURE 2 – Nouvel algorithme de FMN avec contraintes de parcimonie.

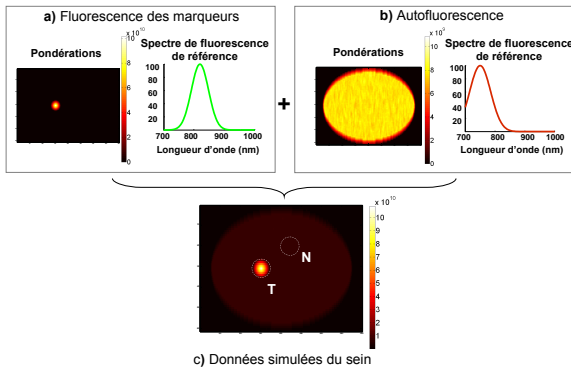


FIGURE 3 – Données de sein simulées sous Matlab : une tumeur marquée par des traceurs fluorescents dont le spectre de fluorescence de référence est connu (a) est simulée à plusieurs profondeurs dans un milieu autofluorescent de spectre lui aussi connu (b). Les données mélangées servent de support à la séparation par FMN (c).

et permet de repousser les limites de la détection de la tumeur de plusieurs *mm* comme présenté figure 5 : sur la courbe verte avec initialisation à départs multiples, les contrastes sont meilleurs plus la tumeur est profonde (donc la détection est également meilleure) que sur la courbe rouge qui représente le contraste obtenu après FMN avec une initialisation aléatoire. Les résultats obtenus ici sont particuliers à l'exemple de simulation, mais représentatifs du comportement de la décomposition FMN sous ces contraintes (des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres simulations) [5].

Enfin sur ce même exemple simulé, l'algorithme de FMN avec contraintes de parcimonie spatiale a été testé. La tumeur recherchée étant parcimonieuse dans les tissus autofluores-

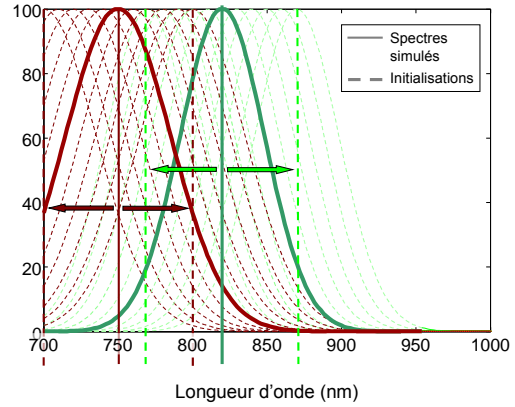


FIGURE 4 – Translation de spectres simulés de -50 nm à +50 nm autour de la position en longueur d'onde choisie pour la simulation : définition d'une gamme d'initialisations à tester pour la matrice  $S$ .

cents, l'algorithme s'y applique bien. La prise en compte des contraintes de parcimonie, et l'effet du seuillage adapté permettent une fois de plus d'améliorer les résultats de détection de la tumeur, comme présenté figure 5 sur les courbes rose et orange.

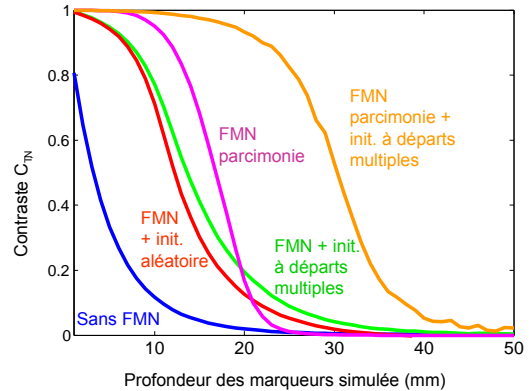


FIGURE 5 – Calcul du contraste tumeur-tissu sain : comparatif de l'efficacité des différentes contraintes ajoutées à la FMN sur les données simulées.

## 4 Exemple *in vivo*

Nous validons à présent la méthode sur des acquisitions obtenues *in vivo*. Deux tubes capillaires respectivement remplis de  $5 \mu\text{l}$  d'Indocyanine Green encapsulé en nanoparticules (ICG-LNP) à  $0.35 \mu\text{M}$  et de  $5 \mu\text{l}$  d'Alexa 750 à  $0.3 \mu\text{M}$  sont placés sous-cutané sur une souris pour simuler des tumeurs marquées (cf. figure 6-a). Les concentrations ont été choisies plus faibles qu'en imagerie du petit animal pour exagérer le signal d'autofluorescence et se placer dans un cas proche de la détection de tumeurs en profondeur dans les tissus. Notre

système dédié à la spectroscopie de fluorescence [5] mesure les spectres de fluorescence en tout point de l'animal ; chaque spectre mesuré est la somme des spectres des marqueurs et de l'auto fluorescence des tissus. La carte des intensités d'émission mesurées pour cette expérience est présentée figure 6-b.

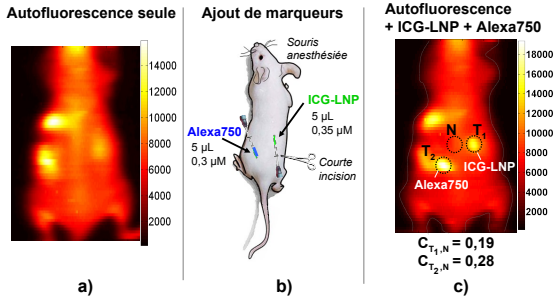


FIGURE 6 – a) Mesurement de l'auto fluorescence de la souris b) Placement des capillaires sous-cutanés sur l'animal, c) Acquisition de fluorescence obtenue.

Nous calculons le contraste  $C_{T,N}$  entre les zones tumorales  $T$  et une zone saine  $N$  afin de mettre en évidence l'amélioration de la détection de tumeurs après FMN. Si  $\bar{T}$  et  $\bar{N}$  sont respectivement les intensités moyennes mesurées en photons par pixel des zones  $T$  et  $S$ , alors :  $C_{T,N} = (\bar{T} - \bar{N})/(\bar{T} + \bar{N})$ . Le contraste varie entre 0 et 1 : plus sa valeur est proche de 1, meilleure est la détection.

Les résultats après séparation des spectres par FMN sont présentés sur la figure 7-a : l'auto fluorescence a été parfaitement éliminée et les marqueurs isolés, permettant d'améliorer la détection des tumeurs. En effet, le contraste tumeur/tissu sain  $C_{1T,N}$  pour l'ICG-LNP est passé de 0.19 avant traitement à 0.84 après FMN, tandis que le contraste  $C_{2T,N}$  pour l'Alexa 750 est passé de 0.28 à 0.96 après FMN (cf. figure 7-b, -c et -d).

## 5 Conclusion

Afin de séparer plusieurs spectres de fluorescence et ainsi éliminer l'auto fluorescence des tissus qui compromet la localisation correcte des tumeurs en imagerie optique de fluorescence, nous avons proposé d'utiliser la méthode de Factorisation en Matrices Non-négatives. Diverses régularisations ont été proposées, et la méthode a été validée avec succès sur données *in vivo*. L'utilisation d'un pré-traitement de données acquises en imagerie optique de fluorescence par FMN et de régularisations appropriées permet d'éliminer l'auto fluorescence des tissus et d'améliorer considérablement la détection et localisation des tumeurs cancéreuses.

## Références

[1] V. Ntziachristos, E.A. Schellenberger, J. Ripoll, D. Yesayan, E. Graves, A. Bogdanov, L. Josephson, and

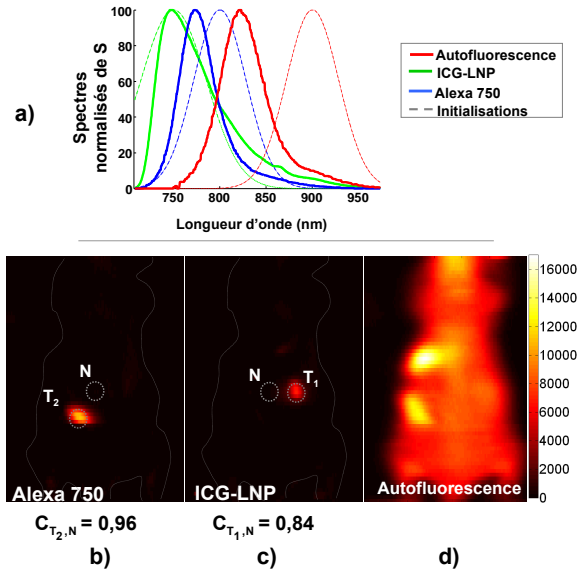


FIGURE 7 – a) spectres séparés obtenus b) Contributions séparées de l'Alexa 750, c) de l'ICG-LNP, et d) de l'auto fluorescence

R. Weissleder, "Visualization of antitumor treatment by means of fluorescence molecular tomography with an annexin v-cy5. 5 conjugate," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 33, pp. 12294, 2004.

[2] D. D. Lee and H. S. Seung, "Algorithms for non-negative matrix factorization," *Advances in neural information processing systems*, vol. 13, pp. 556–562, 2001.

[3] A. Cichocki, S. Amari, A.-H. Phan, and R. Zdunek, *Non-negative Matrix and Tensor Factorizations : Applications to Exploratory Multi-way Data Analysis and Blind Source Separation*, Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2009.

[4] S. Moussaoui, D. Brie, and J. Idier, "Non-negative source separation : range of admissible solutions and conditions for the uniqueness of the solution," in *Proceeding to IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, March 2005, vol. 5, pp. 289–292.

[5] A-S. Montcuquet, L. Hervé, F. Navarro, J-M. Dinten, and J. I. Mars, "Nonnegative matrix factorization : a blind spectra separation method for in vivo fluorescent optical imaging," *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 5, pp. 056009–1 – 056009–14, 2010.

[6] A-S. Montcuquet, L. Hervé, F. Navarro, J-M. Dinten, and J. I. Mars, "n vivo fluorescence spectra unmixing and auto fluorescence removal by sparse non-negative matrix factorization," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. In press, 2011.

[7] A. E. Cerussi, A. J. Berger, F. Bevilacqua, N. Shah, D. Jakubowski, J. Butler, R. F. Holcombe, and B. J. Tromberg, "Sources of absorption and scattering contrast for near-infrared optical mammography," *Academic Radiology*, vol. 8, no. 3, pp. 211–218, 2001.