

# Imagerie microscopique 3D du réseau lacuno-canaliculaire dans l'os humain

ALEXANDRA PACUREANU<sup>1,2,3</sup>, MAX LANGER<sup>1,2</sup>, PEI DONG<sup>1,2</sup>, CHANTAL MULLER<sup>1</sup>, VASILE BUZULOIU<sup>3</sup>, FRANÇOISE PEYRIN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, CREATIS ; CNRS UMR5220 ; Inserm U1044 ; INSA-Lyon ; Université Lyon 1, France

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

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

<sup>1,2,3</sup>joitapac@esrf.fr, <sup>1,2</sup>max.langer@esrf.fr, <sup>1,2</sup>peyrin@esrf.fr

**Résumé** - L'os se renouvelle en permanence et l'équilibre de ce processus de remodelage est décisif pour la santé du squelette. Le réseau lacuno-canaliculaire qui héberge les ostéocytes a montré avoir un rôle crucial dans la régulation du remodelage osseux. L'architecture 3D de ce réseau est toujours partiellement méconnue. Nous avons proposé d'utiliser la micro-tomographie synchrotron pour effectuer les premières études quantitatives en 3D de ce système. Dans ce travail nous présentons une optimisation du système d'acquisition d'images et nous proposons une méthode de segmentation automatique adaptée au réseau lacuno-canaliculaire. La technique de segmentation est basée sur la méthode des ensembles de niveau complétée par une analyse en composante connexe. Nous présentons une évaluation quantitative et qualitative de la méthode.

## 1 Introduction

Au niveau microscopique, nos os se renouvellent tout au long de la vie pour remplacer le tissu endommagé et pour s'adapter à l'environnement mécanique extérieur [1]. Quand ce processus de remodelage est déséquilibré, l'os se fragilise, ce qui peut conduire à des maladies comme l'ostéoporose. Les mécanismes qui contrôlent le remodelage osseux sont très complexes et encore partiellement méconnus en dépit de l'évolution récente de la recherche dans ce sens. Les ostéocytes qui sont les cellules osseuses les plus abondantes ont un rôle fondamental dans la régulation du remodelage [2]. Ces cellules sont logées dans des lacunes ostéocytaires et communiquent entre elles par des petits canaux nommés canalicules. Il est actuellement suggéré que l'architecture du réseau lacuno-canaliculaire (RLC) change avec la maladie ou l'âge [3]. L'étude quantitative de ce réseau est cruciale pour la compréhension des mécanismes du remodelage et pour l'amélioration du diagnostic et du traitement des maladies osseuses.

L'évaluation du RLC se fait traditionnellement à partir de coupes histologiques observées en microscopie optique et plus récemment en microscopie confocale ou microscopie par force atomique [4][5]. Ces méthodes sont limitées à des coupes très fines (correspondant à une ou deux couches de cellules) imagées avec une résolution anisotrope et un champ de vue réduit, ne permettant pas une réelle évaluation 3D qui est indispensable vu le caractère tridimensionnel du RLC et sa complexité.

Nous avons montré la faisabilité de la tomographie synchrotron à l'échelle nanométrique (SR-nanoCT) [6] pour imager en 3D de manière quantitative le RLC. Cette méthode permet une évaluation 3D du RLC ainsi que de la minéralisation de la matrice osseuse, avec un

champ de vue assez large (correspondant à  $574^3 \mu\text{m}^3$  - ~4000 lacunes). Toutefois, la dimension des canalicules (100-600nm en diamètre), la densité et la complexité 3D du RLC, les limitations liées à la dose et à la résolution spatiale du détecteur sont des verrous pour l'acquisition et l'analyse des images.

Dans ce travail nous présentons l'optimisation du système d'acquisition d'images et nous proposons une méthode de segmentation automatique adaptée au RLC. La technique de segmentation est basée sur la méthode des ensembles de niveau complétée par une analyse en composantes connexes.

### 1.1 Optimisation du système d'acquisition d'images

Les images 3D ont été acquises par nano-CT synchrotron sur la ligne ID19 à ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), qui utilise une géométrie d'acquisition parallèle 3D (Figure 1) [7] [8]. Les projections 2D d'un échantillon en rotation autour d'un axe vertical sont enregistrées sur un détecteur (2048x2048 pixels, taille de pixel 280nm). Le détecteur est constitué d'un écran scintillateur, d'un système optique de microscope et d'une caméra refroidi CCD. Le rapport signal sur bruit (RSB) est proportionnel avec la dose d'irradiation qui doit être réduite pour éviter l'endommagement de l'échantillon.

Le scintillateur, qui transforme les rayons X en lumière visible, est un élément déterminant dans ce cas. Son efficacité de conversion influence la dose de radiation nécessaire pour obtenir un RSB acceptable, tandis que sa fonction d'étalement du point limite la résolution spatiale. L'efficacité est directement proportionnelle avec l'épaisseur du scintillateur alors que pour une meilleure résolution, il doit être le plus fin possible.

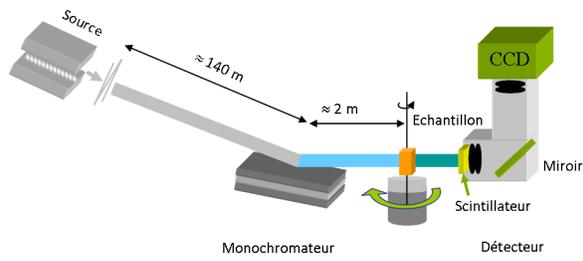


Figure 1: Configuration du système d'acquisition d'images

Nous avons testé différents scintillateurs :  $Y_3Al_5O_{12}$  dopé avec Ce (YAG:Ce\_25 $\mu$ m),  $Gd_3Ga_5O_{12}$  dopé avec Eu (GGG:Eu\_6.2 $\mu$ m),  $Lu_2O_3$ ,  $SiO_2$  dopé avec Tb (LSO:Tb\_4.5 $\mu$ m) [9] et deux caméras « Fast Read Low Noise » [10] (Frelon 2K et Frelon E2V), afin d'optimiser le compromis RSB-dose et la résolution spatiale. Nous avons trouvé que la combinaison LSO\_4.5 $\mu$ m avec la caméra Frelon E2V permet simultanément d'améliorer le RSB par un facteur cinq et de réduire la dose par un facteur deux par rapport à la combinaison YAG:Ce\_25 $\mu$ m, Frelon 2K. De plus, l'épaisseur de seulement 4.5  $\mu$ m du scintillateur LSO:Tb\_4.5 $\mu$ m permet d'améliorer la résolution spatiale.

Des rayons X avec une énergie de 20.5 keV ont été extraits d'un onduleur avec un monochromateur multicouche ( $\Delta E/E$   $10^{-2}$ ) et 2000 projections de l'échantillon ont été enregistrées. La durée totale d'un scan est d'environ 30 minutes. Avec un taille du pixel de 280 nm et un détecteur de 2048x2048 pixels, nous obtenons un champ de vue de  $(573)^3 \mu m^3$  (Figure 2).

## 2 Segmentation d'images

Nous proposons une méthode de segmentation automatique basée sur la méthode des ensembles de niveau s'appuyant sur une initialisation spécifique à notre problème et complétée par un filtrage en composantes connexes.

### 2.1 La méthode d'ensembles de niveau

Soit  $f(\mathbf{x})$  avec  $\mathbf{x} = (x, y, z)$  une image 3D. La méthode d'ensembles de niveaux fait évoluer un ensemble de fonctions  $\phi$  initialisées par  $\phi(x, y, z, 0) = \phi_0(x, y, z)$ :

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = |\nabla \phi| \cdot V \quad (1)$$

où  $V$  est un facteur de vitesse contrôlant la propagation. Parmi différentes formulations du terme de vitesse [11] [12] nous avons choisi l'expression qui contient un terme de régularisation basé sur la courbure moyenne, un terme d'accélération dans les régions homogènes et un terme d'advection. L'équation de propagation peut être exprimée comme :

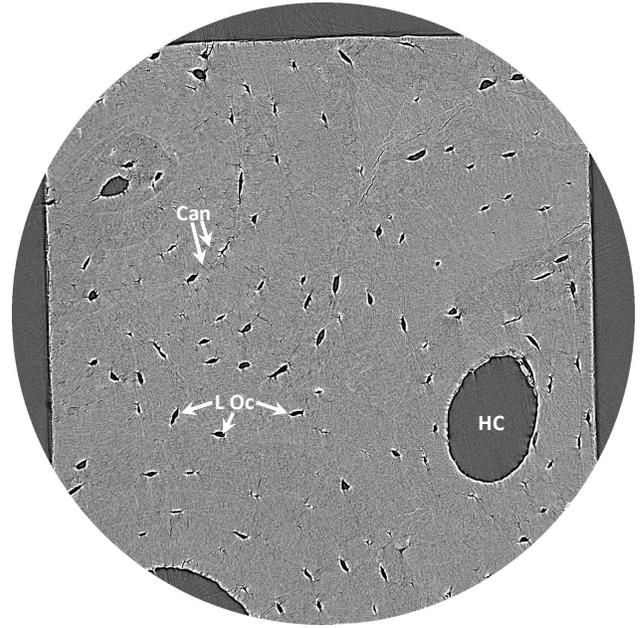


Figure 2: Coupe transversale reconstruite à partir des projections enregistrées pendant la rotation de l'échantillon dans le faisceau (os cortical humain provenant de la diaphyse fémorale). On peut observer des canaux d'Havers (HC), des lacunes ostéocytaires (L Oc) et des canalicules (Can).

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = |\nabla \phi| \left( (\lambda_c k - \lambda_p) d_f - \lambda_a \nabla d_f \cdot \frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) \quad (2) \quad \text{avec}$$

$$d_f = s \circ g_f \quad (3) \quad \text{où}$$

$$g_f(x, y, z) = g(|\nabla(G_\sigma * f)(x, y, z)|) \quad (4)$$

$$s_{\alpha, \beta}(u) = \frac{1}{1 + \exp(-\frac{u - \beta}{\alpha})} \quad (5) \quad \text{et}$$

$$k = \text{div} \left( \frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) \quad (6)$$

où  $s$  est une fonction sigmoïde,  $G_\sigma(x, y, z)$ , une fonction gaussienne d'écart type  $\sigma$  et  $k$  la courbure moyenne. Des tests ont été effectués pour établir une combinaison optimale des paramètres. Les paramètres retenus sont les suivants :

$$\lambda_a = 0, \lambda_c = 40, \lambda_p = 70, \alpha = -1, \beta = 20$$

### 2.2 Initialisation

L'initialisation s'est avérée être une étape cruciale pour la réussite de la segmentation. La finesse des canalicules (1 à 3 voxels de diamètre), leur densité et la diminution locale du contraste rendent la segmentation difficile sans une initialisation adaptée. Celle-ci a été construite comme une pré-segmentation automatique et rapide composée d'un seuillage maximisant l'entropie interclasse combiné avec un filtrage rehaussant les structures tubulaires et une opération morphologique. La Figure 3c illustre les améliorations apportées par le filtrage qui arrive à reconnecter des canalicules séparées à cause du faible contraste.

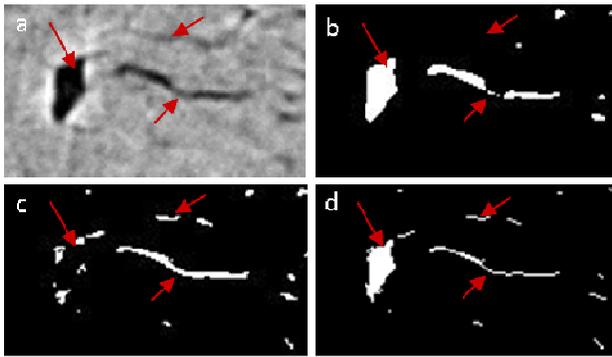


Figure 3: Construction de l'initialisation de la méthode des ensembles de niveau : Les flèches indiquent des points d'intérêt : a) ROI originale; b) Seuillage par entropie maximale; c) Image filtrée seuillée par entropie maximale; d) Image initiale obtenue

Le filtre est basé sur l'analyse locale des valeurs propres de la matrice hessienne [13][14] et nous avons choisi le critère proposé en [13] avec les paramètres  $\sigma=1$ ,  $\alpha_1=0.5$ ,  $\alpha_2=2$ . Pour récupérer les lacunes (forme planaire) éliminées par le filtre de tubularité nous combinons l'image originale seuillée avec la carte du filtrage seuillée par une opération logique de disjonction (Figure 3c-d). L'opération morphologique d'érosion avec un élément structurant en croix de rayon 1 est motivée par l'élimination des petits éléments parasites et par l'amincissement des canalicules qui tendent à être élargies par le seuillage (Figure 3b-d).

### 2.3 Analyse en composante connexe

L'obtention d'un RLC connecté est un critère pour l'évaluer la qualité de la segmentation. Après segmentation nous effectuons donc une analyse en composantes connexes permettant d'une part de filtrer les composantes résiduelles non-connectées de dimensions inférieures à un seuil ( $30 \text{ voxels} - 0.6\mu\text{m}^3$ ) et d'autre part de quantifier le nombre de composantes connexes du résultat. La méthode mise en oeuvre est basée sur l'algorithme de Hoshen and R. Kopelman [15].

## 3 Résultats

Afin d'évaluer quantitativement la méthode de segmentation nous avons construit un fantôme (Figure 4) basé sur une image réelle (sous-volume de  $256^3$  voxels) pour lequel nous avons évalué le pourcentage de voxels bien détectés et l'erreur de détection en termes du nombre de composantes connexes. Le pourcentage de voxels bien classés est de 69.5% dans l'image pré-segmentée utilisée comme initialisation et de 94.7% après segmentation par la méthode des ensembles de niveaux avec les paramètres optimaux et filtrage des composantes connexes inférieures à 30 voxels. L'erreur de détection des composantes connexes de 22.6% dans l'initialisation est réduite à 3.7% dans l'image segmentée. La Figure 5 présente le résultat obtenu sur une région centrée autour d'un ostéon.

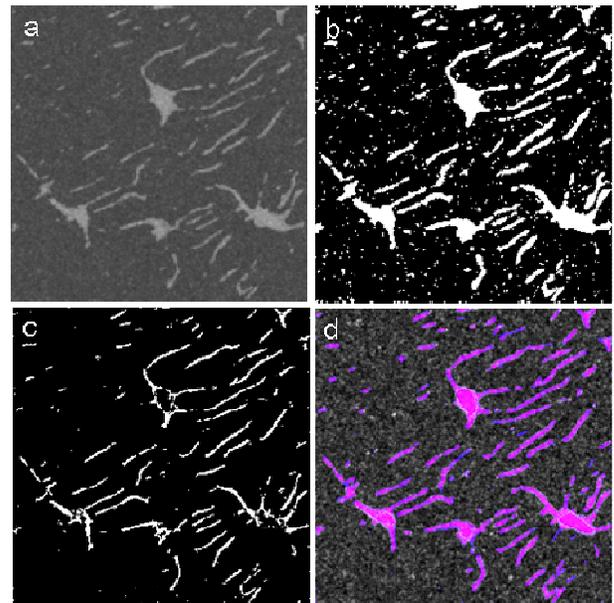


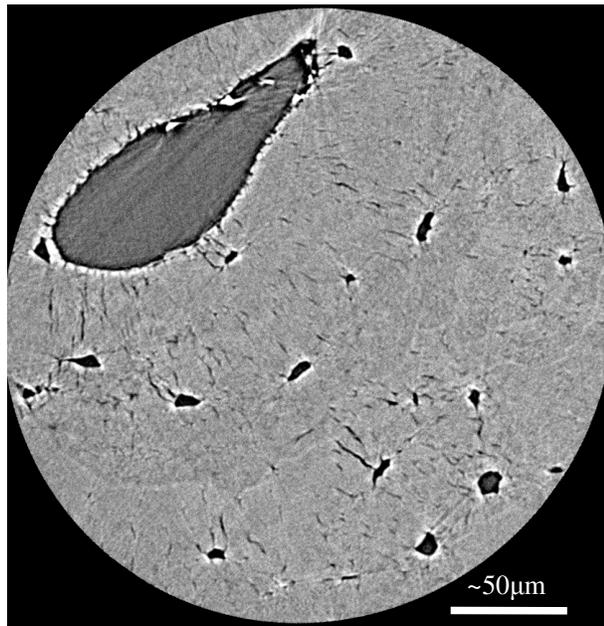
Figure 4: Résultats sur le fantôme (MIP sur 10 coupes): a) Image initiale; b) Seuillage maximisant l'entropie interclasse sur (a); c) Seuillage maximisant l'entropie interclasse sur l'image filtrée; d) Résultat de la segmentation ( $\beta=20$ ) superposé sur l'image originale.

## 4 Conclusion

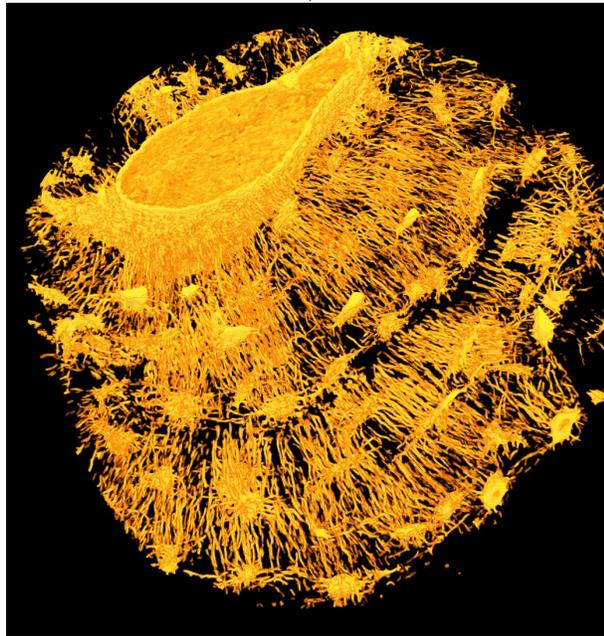
La possibilité d'étudier de manière quantitative et automatique le réseau lacuno-caniculaire en 3D est totalement nouvelle et cela ouvre de nombreuses perspectives pour la compréhension des maladies osseuses. Traditionnellement ces études se font à partir d'images 2D analysées manuellement. Nous avons proposé d'utiliser la nano-CT synchrotron pour imager le RLC mais il a été nécessaire d'optimiser le dispositif d'acquisition compte tenu de la finesse des structures. Le développement d'une méthode de segmentation automatique basée sur la méthode des ensembles de niveau donne des résultats quantitatifs et qualitatifs satisfaisants et paraît prometteur pour des études ultérieures.

## 5 Références

- [1] R. Huiskes, R. Ruimerman, G. H. van Lenthe, and J. D. Janssen, "Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone," *Nature*, vol. 405, no. 6787, pp. 704-706, Jun. 2000.
- [2] L. F. Bonewald, "The Amazing Osteocyte," *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, Dec. 2010.
- [3] M. L. Knothe Tate, T. W. Bauer, A. E. G. Tami, and U. Knothe, "Micropathoanatomy of osteoporosis: indications for a cellular basis of bone disease," *Advances in Osteoporotic Fracture Management*, vol. 2, pp. 10,11, 2002.



a)



b)

Figure 5 : Le réseau lacuno-canaliculaire dans un ostéon autour du canal haversien: a) ROI dans une coupe tomographique reconstruite; b) Visualisation en 3D du résultat de la segmentation proposée dans un sous-volume.

- [4] Y. Sugawara, H. Kamioka, T. Honjo, K.-ichi Tezuka, and T. Takano-Yamamoto, "Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy," *Bone*, vol. 36, no. 5, pp. 877-83, May. 2005.
- [5] Y. Lin and S. Xu, "AFM analysis of the lacunar-canalicular network in demineralized compact

bone," *Journal of Microscopy*, p. no-no, Aug. 2010.

- [6] A. Pacureanu, A. Larrue, Z. Peter, and F. Peyrin, "3D non-linear enhancement of tubular microscopic bone porosities," in *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2009. ISBI '09. IEEE International Symposium on*, 2009, pp. 602-605.
- [7] M. Salomé et al., "A synchrotron radiation microtomography system for the analysis of trabecular bone samples," *Medical Physics*, vol. 26, no. 10, pp. 2194-2204, Oct. 1999.
- [8] T. Weitkamp et al., "Status and evolution of the ESRF beamline ID19," *AIP Conference Proceedings*, vol. 1221, no. 1, pp. 33-38, Apr. 2010.
- [9] P.-A. Douissard et al., "A novel epitaxially grown LSO-based thin-film scintillator for micro-imaging using hard synchrotron radiation," *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 17, no. 5, pp. 571-583, Jul. 2010.
- [10] J.-C. Labiche et al., "Invited article: The fast readout low noise camera as a versatile x-ray detector for time resolved dispersive extended x-ray absorption fine structure and diffraction studies of dynamic problems in materials science, chemistry, and catalysis," *Review of Scientific Instruments*, vol. 78, no. 9, p. 091301, 2007.
- [11] J. A. Sethian, *Level set methods and fast marching methods: evolving interfaces in computational geometry, fluid mechanics, computer vision, and materials science*. Cambridge University Press, 2000.
- [12] V. Caselles, R. Kimmel, and G. Sapiro, "Geodesic active contours," in *Computer Vision, IEEE International Conference on*, Los Alamitos, CA, USA, 1995, vol. 0, p. 694.
- [13] Y. Sato et al., "Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images," *Medical Image Analysis*, vol. 2, no. 2, pp. 143-168, Jun. 1998.
- [14] A. Frangi, W. Niessen, K. Vincken, and M. Viergever, "Multiscale Vessel Enhancement Filtering," in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention — MICCAI'98*, 1998, p. 130.
- [15] J. Hoshen and R. Kopelman, "Percolation and cluster distribution. I. Cluster multiple labeling technique and critical concentration algorithm," *Physical Review B*, vol. 14, no. 8, p. 3438, Oct. 1976.