

# Détection de différence de densité de marqueurs fluorescents en microscopie superrésolue : approche pointilliste ou texturale ?

Ali AHMAD<sup>1,2</sup>, Carole FRINDEL<sup>2</sup>, David ROUSSEAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Angevin de Recherche en Ingénierie des Systèmes (Laris) - Université d'Angers  
62 Avenue Notre Dame du Lac , 49000 Angers, France

<sup>2</sup>Centre de Recherche en Acquisition et Traitement de l'Image pour la Santé (Creatis) - Insa Lyon  
7 Avenue Jean Capelle O, 69100 Villeurbanne, France

ali.ahmad@insa-lyon.fr, carole.frindel@creatis.insa-lyon.fr  
david.rousseau@univ-angers.fr

**Résumé** – Nous considérons le problème de l'estimation de densité de marqueurs fluorescents dans des cellules uniques imagées en microscopie superrésolue. Cette problématique est importante en bioimagerie où la densité de ces marqueurs peut traduire l'état sain ou pathologique des cellules, l'organisation spatiale de l'ADN, ou encore l'état dans le cycle de la division cellulaire. Avec les nouvelles microscopies superrésolues et les circuits de microfluidiques associés, il est possible de détecter au sein de cellules uniques les biomarqueurs individuellement ou collectivement sous la forme d'une texture suivant la qualité de la réponse impulsionnelle du microscope. Dans ce travail, nous proposons d'étudier la question de la détection de la différence de densité suivant une approche individuelle (pointilliste) ou collective (texturale) en comparant les performances en fonction de la taille de la réponse impulsionnelle.

**Abstract** – We consider the problem of of fluorescent marker density estimation in single cells imaged by superresolved microscopy. This problem is important in bioimaging since the density of these markers can reflect the healthy or pathological state of cells, the spatial organization of DNA, or the state in the cycle of cell division. With the new superresolved microscopes and associated microfluidic devices, biomarkers can be detected in single cells individually or collectively as a texture depending on the quality of the microscope impulse response. In this work, we propose to adress the question of density difference detection according to an individual (pointillist) or collective (textural) approach by comparing the performances according to the size of the impulse response.

## 1 Introduction

La microscopie a connu ces dernières années de véritables révolutions grâce au couplage d'innovations en chimie via la production de nouveaux marqueurs fluorescents, en optique avec les lasers accordables en longueur d'ondes et en durée d'impulsions ou encore en microfluidique amenant l'échantillon sous l'objectif de façon automatique. Il est désormais possible d'observer en 2D ou 3D des détails subcellulaires dans des cellules uniques avec des résolutions qui vont au-delà de ce que prédisait le critère de Rayleigh pour un microscope classique [1][2]. Toutefois, les systèmes superrésolus sont souvent encore au stade de prototypes "maison" et ne sont actuellement pas encore transférés en utilisation industrielle ou même sous forme de plateforme de microscopie ouverte à des utilisateurs non experts de l'instrumentation. Une raison de ce retard de transfert est que la superrésolution ne vient pas sans son lot de contraintes de micropositionnement et d'alignement qui vont croissant à mesure que la taille de la fonction impulsionnelle diminue. Une manière de relâcher certaines contraintes consiste à coupler le choix de l'optique en fonction des questions biologiques posées et du traitement d'images associé.

Dans cette communication, nous considérons des images de cellules uniques venant de microscopie de type lattice light sheet microscopy (LLSM) [3] dans lesquelles des marqueurs fluorescents de la chromatine ont été activés (voir Figure 1 A). Nous considérons la tâche informationnelle qui consiste à détecter une différence de densité de marqueurs dans ces cellules. C'est une étape clé qui est utile dans de nombreuses problématiques biologiques comme la détection de l'état de santé d'une cellule ou l'organisation spatiale de l'ADN le long duquel ces marqueurs sont positionnés ou encore pour déterminer l'état des cellules dans le cycle de la division cellulaire. Pour cette problématique de détection binaire de différence de densité, il n'est pas garanti a priori que la superrésolution soit indispensable. Nous étudions les performances d'algorithmes basés sur l'identification de chaque marqueur (approche pointilliste) ou la caractérisation de la texture formée par ces marqueurs (approche texturale). Nous comparons les performances de ces algorithmes en explorant le passage d'une situation superrésolue à une situation sousrésolue. Ceci est réalisé via des simulations de réponses impulsionnelles (PSF) comme montré dans la Figure 1 B.

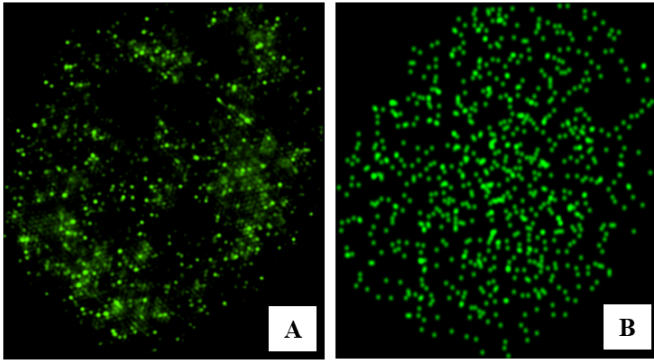


Figure 1 – Panel A: Image LLSM 2D réelle d’une cellule cancéreuse. Panel B: Image synthétique générée par une distribution aléatoire de marqueurs et convolution avec un noyau gaussien simulant la PSF.

## 2 Simulation d’images microscopiques

La position des marqueurs fluorescents est générée de façon aléatoire selon deux distributions normales sur la largeur et la hauteur des images. Les deux classes de cellules, saine ( $C_1$ ) et pathologique ( $C_2$ ), sont créées avec une différence d’écart type entre les distributions (Figure 2.A). En ajustant empiriquement pour correspondre aux observations réelles (voir Figure 1A et B), les paramètres des distributions pour les cellules saines sont ( $C_1$ ) :  $N_x(126, 100)$ ,  $N_y(126, 100)$ , nombre total de marqueurs = 3000, surface de la cellule 10000 pixels, densité des marqueurs 0.3. Pour les cellules pathologiques ( $C_2$ ) nous avons  $N_x(126, 100)$ ,  $N_y(126, 90)$ , nombre total de marqueurs = 3000, surface de la cellule 9000 pixels, densité des marqueurs est 0.33; avec  $N_x$ ,  $N_y$  les lois normales sur la position des marqueurs. La différence de densité entre les classes  $C_1$  et  $C_2$  est de 0.03. Cette petite différence de densité entre les deux classes de cellules correspond à un ordre de grandeur typique pour un écart entre des cellules saines et cancéreuses qui peut être mesuré par analyse génétique des sites exprimés par les marqueurs. Nous utilisons ici cet écart pour comparer les deux approches: pointilliste et texturale.

La PSF du microscope superrésolu est modélisée simplement par un noyau gaussien de taille  $\sigma_{psf}$ . Les images à la sortie du simulateur sont le produit de la convolution de la distribution des marqueurs avec la PSF (Figure 2.B). Chaque image est de dimension  $256 \times 256$  pixels. La performance de la classification entre les deux cellules  $C_1$  et  $C_2$  est étudiée selon les valeurs du  $\sigma_{psf}$ . Cette situation correspond au cas pratique en instrumentation où l’on souhaite optimiser la PSF du microscope pour une tâche informationnelle donnée. Ici, il s’agit de trouver les conditions de PSF qui permettent d’obtenir la meilleure classification binaire entre les cellules  $C_1$  et  $C_2$ .

La gamme d’exploration de la taille de la PSF  $\sigma_{psf}$ , est adimensionnée par une distance entre marqueurs:

$$k = \arg_{min} \left( \frac{d_{minC_1C_2}}{\sigma_{psf}} \right) \quad (1)$$

où  $d_{minC_1C_2}$  est la distance minimale entre les marqueurs dans

les deux classes des cellules  $C_1$  et  $C_2$ . Cette distance calculée pour le jeu de donnée simulé est  $d_{minC_1C_2} = 1.02$ . Nous explorons des valeurs de  $\sigma_{psf}$  pour lesquelles autour des valeurs de  $k = 1$  correspondant intuitivement au passage d’un régime superrésolu ( $k < 1$ ) au cas sousrésolu ( $k > 1$ ) comme le montre la Figure 2.B.

## 3 Approche Texturale

Dans le cas de l’approche texturale, nous considérons une méthode de base avec les 14 coefficients d’Haralick calculés sur la matrice de cooccurrence (GLCM) [5] et utilisés comme attributs de discrimination entre chaque classe d’images. La matrice de cooccurrence est calculée en considérant les pixels du voisinage dans les quatre directions: 0, 45, 90 et 135 degrés. Le nombre de pixels du voisinage considéré dans la GLCM est choisi tel qu’il soit un multiple de la valeur maximale du  $\sigma_{psf}$  et il est optimisé expérimentalement. Cette valeur permet d’avoir une performance de classification maximale pour l’approche texturale.

## 4 Approche pointilliste

Dans la littérature, plusieurs algorithmes de localisation des marqueurs fluorescents ont été développés. Nous utilisons une méthode de l’état de l’art récemment introduite UNLOC (*Unsupervised particle localization*) dans notre étude [4]. UNLOC, algorithme sans paramètre et rapide, approchant le Cramer-Rao lié aux particules à haute densité et sans aucune connaissance préalable de leur intensité. Il s’est révélé particulièrement robuste dans les cas de densités de particules élevées et dans une large gamme de rapports signal à bruit. Nous étudions statistiquement les marqueurs localisés par UNLOC en calculant les distances entre eux, les distances à la moyenne et les distances entre les marqueurs les plus proches. À partir de ces distances, nous ajustons avec les distributions statistiques théoriquement attendues Rayleigh (0, *moyenne*) pour les distances entre marqueurs, exponentielle (0, *moyenne*) pour les distances à la moyenne et la loi d’extremum généralisée *GEV* (*forme, écart type, moyenne*) pour les distances aux marqueurs les plus proches respectivement en utilisant le critère de l’information bayésienne (BIC). Nous déterminons les paramètres de chaque distribution comme indiqué dans la Figure 3. Ces paramètres statistiques sont utilisés dans l’apprentissage et la classification comme des attributs pour chaque classe de cellule.

## 5 Classification

Le même type de classifieur séparateur à vaste marge (SVM) avec un noyau linéaire est utilisé dans l’apprentissage et la classification des deux classes d’images dans les deux approches pointilliste et texturale. Nous testons la performance pour 9 va-

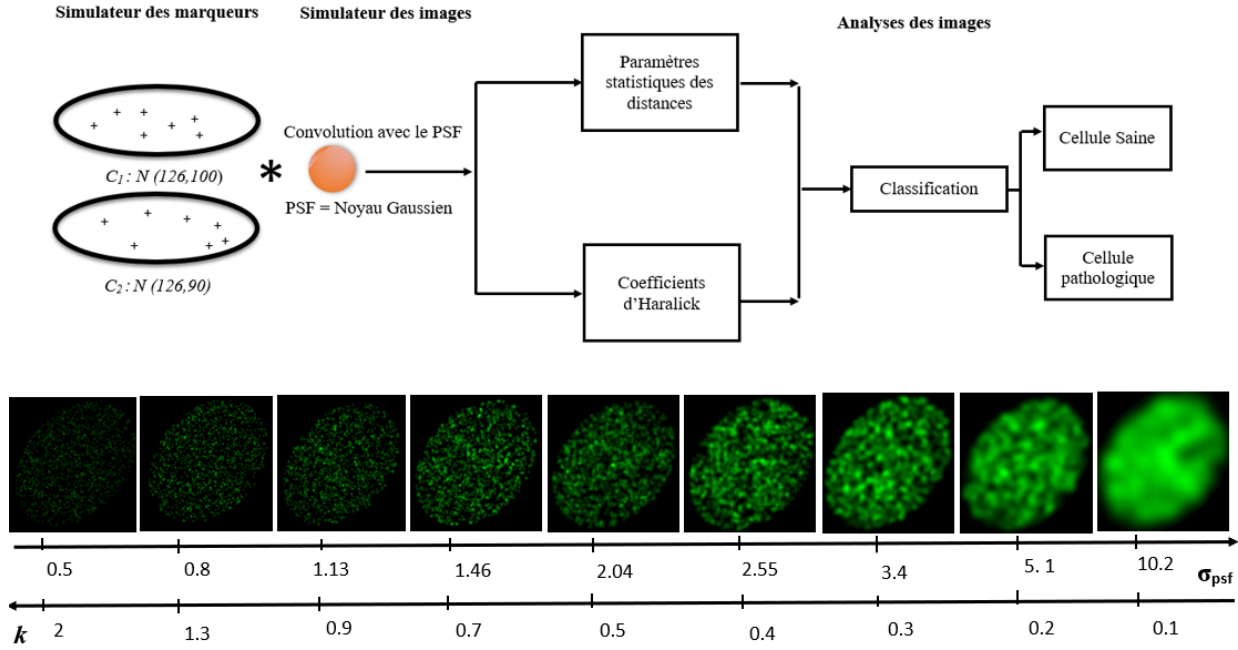


Figure 2 – Résumé visuel de l'étude. Panel A: le pipeline de l'algorithme de simulation des deux classes de cellules avec des densité de marqueurs fluorescents distincts. L'image acquise par le microscope est simulée par la convolution de la distribution des marqueurs avec la PSF. Pour classer les deux types de cellules deux approches sont étudiées pour différentes valeurs de PSF : une pointilliste et une autre texturale. Panel B: Exemples d'images microscopiques synthétiques pour différentes valeurs de  $\sigma_{psf}$  et du rapport  $k$  correspondant selon l'Eq. (1).

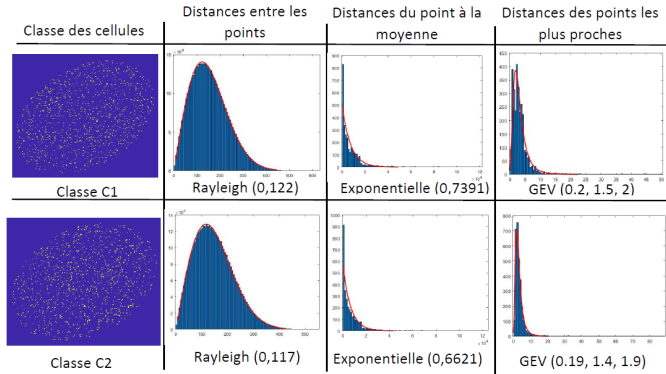


Figure 3 – Ajustement des distances avec les distributions statistiques théoriquement attendues pour une cellule ( $C_1$ ) sur la première ligne et une cellule ( $C_2$ ) sur la seconde ligne.

leurs du  $\sigma_{psf}$  différentes. La base de données pour chaque valeur du  $\sigma_{psf}$  est formée de 4000 images d'apprentissage, avec 2000 pour chaque classe, et 500 images de test (respectivement 250 images pour chaque classe).

## 6 Résultats

Les performances de classification en fonction des valeurs de  $\sigma_{psf}$  sont présentées dans la Figure 4. D'une façon glo-

bale, les performances de l'approche texturale dépassent celle de l'approche pointilliste. Bien qu'il soit délicat de faire un comparaison absolue, on peut souligner que les coefficients d'Haralick constituent une méthode de base pour une approche texturale et que d'autres approches pourraient être plus performantes, alors que la méthode UNLOC en détection dense est une nouvelle référence de l'état de l'art. On pourrait toutefois discuter le fait que la taille de l'espace des descripteurs n'est pas la même pour l'approche texturale (14 descripteurs) et pour l'approche pointilliste (5 descripteurs). Une étape de réduction de dimensions permettrait une comparaison sans doute plus juste. De façon plus relative, on peut commenter les performances de l'approche texturale qui évoluent de façon monotone quand on passe de la situation sousrésolu à la situation superrésolu. Cependant, comme le montre le Tableau 1 le contraste entre les classes se trouve davantage sur l'entropie et la dissimilarité en situation superrésolu alors qu'on se base d'avantage sur l'énergie et la corrélation en situation sousrésolu (quand tout est flou). Les performances de l'approche pointilliste évoluent de façon non monotone (autour de  $k = 0.5$ ) car, comme le montre la Figure 5, au passage du régime sousrésolu au régime superrésolu, la classe la plus dense est moins bien estimée alors que l'autre classe est encore superrésolu. Ceci crée un régime plus contrasté entre les deux classes de densités qui disparaît quand  $k > 0.7$  et que les deux classes de cellules sont imagées en régime superrésolu.

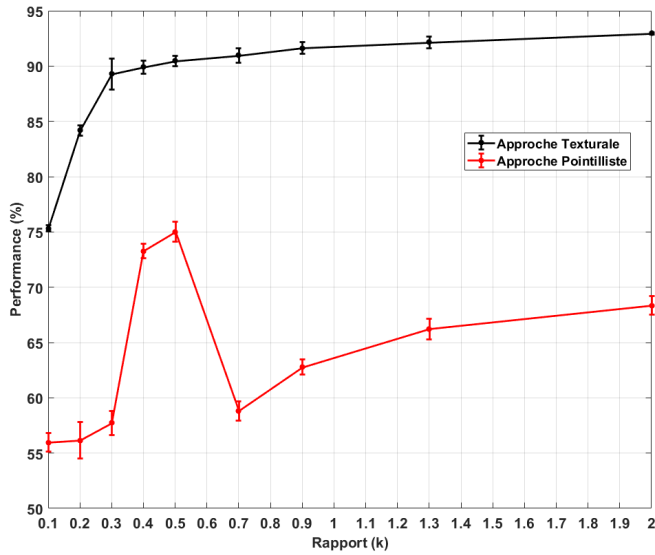


Figure 4 – Performance de classification avec les écarts types pour les deux approches texturale et pointilliste en fonction des tailles de la PSF.

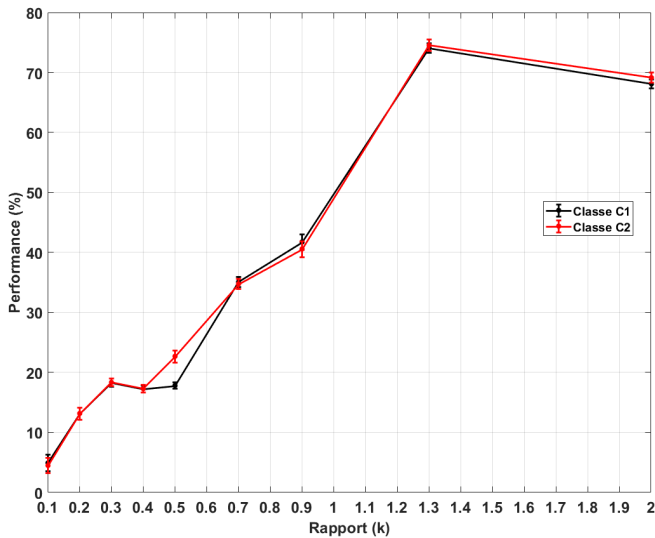


Figure 5 – Performance du UNLOC avec les écarts types en fonction des tailles de la PSF.

## 7 Conclusion

Dans cette étude, nous avons simulé deux classes d’images de cellules (saine et pathologique) avec des marqueurs fluorescents dont la différence de densité est très faible. Nous avons ensuite simulé différentes tailles de PSF de microscopes autour du passage de l’état sous-résolu à l’état superrésolu des marqueurs. Ces jeux de données synthétiques nous ont servi à étudier la détection de la différence de densité de marqueurs. Il ressort de cette étude que l’approche texturale l’emporte sur

Table 1 – Différences relative en % des coefficients d’Haralick entre les deux classes de cellules pour une taille de PSF petite, intermédiaire et grande.

Coefficients d’Haralick	Différence d’entropie	Dissimilarité	Énergie	Corrélation	Homogénéité	Sommes des variances
$\sigma_{psf} = 0.5$	1.2	2.2	3.3	0.9	1.8	2.1
$\sigma_{psf} = 2.04$	0.6	1.1	9.4	3.6	1.3	1
$\sigma_{psf} = 10.2$	0.5	0.9	8.1	3.6	0.3	0.9

l’approche pointilliste dans les régimes sous résolus comme dans les régimes superrésolus. Dans cette communication, la PSF du microscope simulé était volontairement naïve sous la forme d’un flou gaussien 2D. La méthodologie présentée est toutefois transposable sans difficulté à tout type de PSF plus réaliste et peut également être étendue en 3D. Ce travail pourra donc être utilisé en instrumentation pour valider la qualité d’une PSF pour une tâche informationnelle donnée.

## 8 Remerciements

Ce travail a été financé par le projet EU H2020 FET Open, PROCHIP, “Chromatin organization PROFiling with high-throughput super-resolution microscopy on a CHIP”, grant agreement no. 801336 (<https://pro-chip.eu/>).

## References

- [1] M. Lakadamyali et M. P. Cosma. Advanced microscopy methods for visualizing chromatin structure. *FEBS letters*, vol. 589, no 20, p.3023-3030, 2015.
- [2] S. S. Ryabichko, A. N. Ibragimov, L. A. Lebedeva, E. N. Kozlov et Y. V. Shidlovskii. Super-Resolution Microscopy in Studying the Structure and Function of the Cell Nucleus. *Acta Naturae*, vol. 9, no. 4 (34), 2017.
- [3] E. H. Stelzer. Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology. *Nature Methods*, vol. 12, no. 1, P. 23-26, 2015.
- [4] S. Maifert, J. Touvier, L. Benyoussef, R. Fabre, A. Rabaoui, M. C. Blache et N. Bertaux. “A Theoretical High-Density Nanoscopy Study Leads to the Design of UNLOC, a Parameter-free Algorithm”, *Biophysical Journal*, vol. 115, no. 3, p. 565-576, 2018.
- [5] R. M. Haralick et K. Shanmugam. Textural features for image classification, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 6, P. 610-621, 1973.