

Vers une prédiction automatique du potentiel migratoire de cellules cancéreuses par détection, comptage et classification.

T.Q. Syed^(*), A. Cartier-Michaud^(*), V. Vigneron^(*), S. Lelandais^(*,),
C. Charrière-Bertrand^(*), C. Montagne^(*), G. Barlovatz-Meimon^(*),
M. Malo^(*)**

() Laboratoire IBISC - CNRS FRE 3190 - Université d'Evry Val d'Essonne
40, rue du PELVOUX – 91020 EVRY CEDEX – France*

*(**) Département Qualité, Logistique Industrielle et organisation, IUT d'EVRY
22, allée Jean ROSTAND – 91025 EVRY CEDEX - France*

tahir.syed@ibisc.univ-evry.fr, s.lelandais@iut.univ-evry.fr

Sections de rattachement : 61 & 65

Secteur : Secondaire

RESUME : Cet article présente un travail mené conjointement par deux équipes du laboratoire IBISC : l'équipe DYNAMIC, constituée de biologistes expérimentaux, et l'équipe TADIB, spécialisée en traitement de données et d'images. L'objectif final de ce travail est de proposer aux biologistes un logiciel d'analyse automatique d'images qui, à partir de vues prises sur un microscope apotome ZEISS, permette d'évaluer le pourcentage de cellules appartenant à des classes prédéterminées. En effet, l'équipe DYNAMIC travaille sur la potentialité de migration de cellules cancéreuses mises en culture, en étudiant les occurrences de cellules morphologiquement différentes et potentiellement plus invasives. Après avoir exposé la problématique et expliqué le mode opératoire permettant d'acquérir les images, nous nous attarderons sur les différentes difficultés liées à ces images : gradient de luminosité d'orientation variable, faible rapport signal à bruit, éclairage rasant provoquant une rupture des contours... Si chacun de ces problèmes peut être résolu, la présence de l'ensemble de ces difficultés nécessite la mise en place d'une chaîne complète de prétraitements permettant d'obtenir une image correcte des écarts-types, image servant de support au calcul des composantes connexes présentes dans l'image. Par la suite, filtrage par une différence de gaussiennes inversées appliqué sur l'image des écarts-type permet d'obtenir une image dite de « halo » mettant en évidence la position du centre des cellules et rendant possible l'opération de comptage. Cette approche par filtrage est comparée à une approche par transformée de Hough. Les résultats présentés illustrent les limites respectives de chaque méthode.

MOTS-CLÉS : Traitement des images – Segmentation – Imagerie bio-cellulaire.

1.Introduction

Des cellules saines ayant évolué vers l'état cancéreux peuvent opter pour deux types de migration cellulaire : la migration mésenchymateuse, migration lente caractérisée par des cellules de forme allongée, ou la migration amiboïde, migration rapide caractérisée par des cellules de forme ronde et « blebbante » qui est conjointe à un échappement cellulaire de la tumeur primaire avec comme pronostic une forte probabilité de création de métastases. La question qui se pose aux biologistes est de savoir pourquoi des cellules passent du mode de migration mésenchymateuse au mode de migration amiboïde. L'hypothèse faite par l'équipe DYNAMIC est que cette évolution du comportement est liée au micro-environnement cellulaire et en particulier à la présence de la molécule PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) qui « encouragerait » ce comportement « métastatique » (Malo et al. 2006). La validation d'une telle hypothèse permettrait d'envisager de modifier le micro-environnement d'une tumeur primaire pour éviter la multiplication des sites cancéreux à travers le développement de métastases. Le problème est que, pour valider cette hypothèse, de nombreuses observations sont nécessaires.

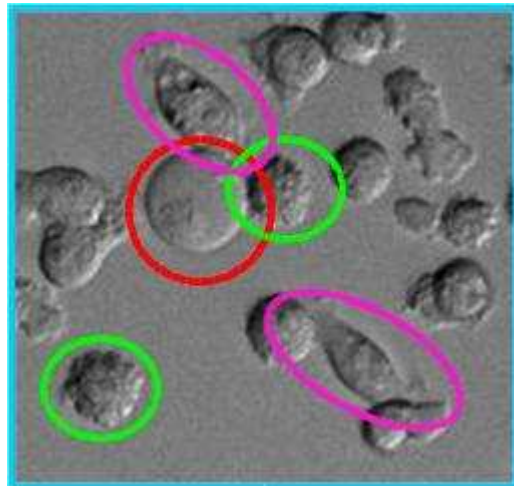


Figure n°1. *Les différentes morphologies cellulaires*

Ces observations se font sur des cultures de cellules vivantes photographiées au microscope. Sur ces images, on va compter le nombre de cellules de chaque classe : non migrante (ronde et lisse), mésenchymateuse (allongée) et amiboïde (ronde et blebbante), comme illustré sur la figure 1, et évaluer les pourcentages de chaque classe en fonction de la composition du micro-environnement et de la durée écoulée. Le travail de culture est déjà long et délicat. Rajouter à cela des opérations de comptage et de classification « manuelle » rendent le travail particulièrement fastidieux. D'où l'intérêt du

développement d'un logiciel automatique de traitement et analyse des images qui dégage les biologistes de cette tâche et leur permet de prétendre à une validation de leur hypothèse sur une analyse d'une population cellulaire de grande taille.

Dans cet article nous allons nous focaliser sur la procédure de détection et comptage des cellules présentes dans l'image ce qui correspond à la première étape de notre travail. L'article est organisé comme suit. La partie 2 permettra de présenter la complexité des images soumises par les biologistes. Dans la partie 3 nous exposerons les prétraitements réalisés pour obtenir une certaine homogénéité dans les images. La partie 4 exposera la méthode développée pour détecter les centres des cellules et la partie 5 permettra de mesurer l'efficacité des traitements à travers la présentation des résultats du comptage. L'exposé des travaux futurs viendra conclure cet article.

2. Les images à traiter

Les images que nous allons traiter sont acquises par un microscope AxioVert 200 avec chambre d'incubation, de la société ZEISS. C'est un microscope qui permet d'obtenir une émulation du comportement de la cellule vivante. Les cellules observées sont issues de deux lignées cellulaires différentes :

- SW620, qui correspond à des cellules provenant de tumeurs colorectales, de diamètre moyen égal à $10\ \mu\text{m}$, qui seront observées à un grossissement X40 ;
- MDA, qui correspond à des cellules provenant de tumeurs mammaires, de diamètre moyen égal à $20\ \mu\text{m}$, qui seront observées à un grossissement X10.

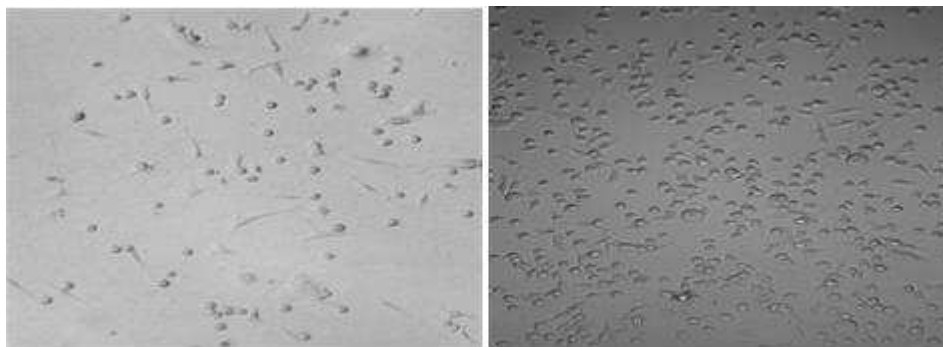


Figure n°2. Exemple d'images à traiter. A gauche : Niveau de gris moyen égal à 180 et SNR égal 18,6. A droite : Niveau de gris moyen égal à 80 et SNR égal 9,8.

Les cultures « in vitro » des cellules sont déposées sur des lames, elles-mêmes installées dans des boîtes comportant quatre puits dans lesquels la lumière subit des

réflexions variées entraînant différents artefacts sur les images: rapport signal à bruit très faible, variation de la moyenne du niveau de gris d'une image à l'autre, gradient de luminosité d'orientation variable, éclairage directionnel provoquant une différence de visibilité des contours qui deviennent sur ou sous exposés. La figure n°2 illustre certaines de ces problématiques.

La chaîne de traitements proposés va donc comprendre une première partie de traitements bas-niveaux permettant de corriger les difficultés énoncées ci-dessus. Dans un deuxième temps nous renforcerons la visibilité des cellules afin de pouvoir segmenter et compter les cellules présentes.

3.Prétraitement des images

La luminosité de l'image est corrigée de manière adaptative afin de prendre en compte les variations de niveau et de direction de l'éclairage. Deux approches ont été testées. Nous présentons ici une approche dite « 3D » qui consiste en la modélisation de la surface des niveaux de gris de l'image par l'équation d'un plan [1]. Pour chaque pixel de coordonnées (x,y) et de niveau de gris $I(x,y)$, une valeur modélisée de luminance $I_c(x,y)$ est calculée en utilisant l'équation [2] dans laquelle a , b et c sont les paramètres du plan calculés en faisant la moyenne des niveaux de gris dans un voisinage donné.

$$ax + by + I_c(x, y) + c = 0 \quad [1]$$

L'image corrigée $I^*(x,y)$ est obtenue à partir de l'équation [2] :

$$I^*(x, y) = I(x, y) - I_c(x, y) - I_0 \quad [2]$$

où I_0 représente la moyenne des niveaux de gris de l'image d'origine. La figure n°3 illustre les différentes étapes de ce processus de correction de la luminosité.

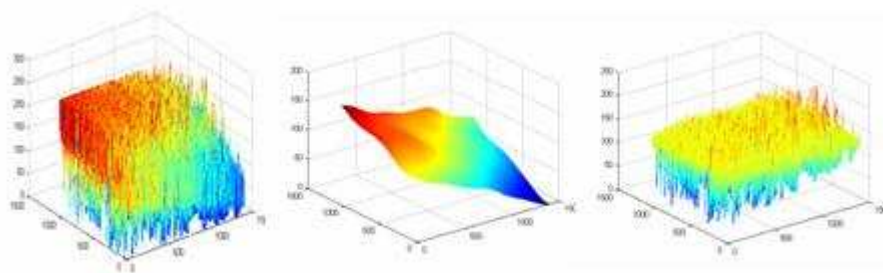


Figure n°3. Correction adaptative de l'image initiale. A gauche : représentation « 3D » des niveaux de gris, soit $I(x,y)$. Au centre : la surface du plan modélisant la luminosité, soit $I_c(x,y)$. A droite : la représentation « 3D » des niveaux de gris dans l'image corrigée $I^*(x,y)$.

Malgré cette correction de luminosité, la séparation des cellules du fond restait difficile en utilisant des algorithmes classiques de seuillage (Otsu 1979) du fait de l'homogénéité des valeurs de niveaux de gris entre le fond de l'image et l'intérieur des cellules. En utilisant la constatation que les cellules présentent un aspect « texturé » alors que le fond de l'image est quasi uniforme, nous avons réalisé un rehaussement de contraste en remplaçant la valeur du niveau de gris de chaque pixel par la valeur de son écart-type calculé dans un voisinage de taille 3x3 pixels. La figure n°4 présente cette transformation. On constate maintenant que les cellules sont bien visibles dans l'image, apparaissant en clair sur un fond sombre.

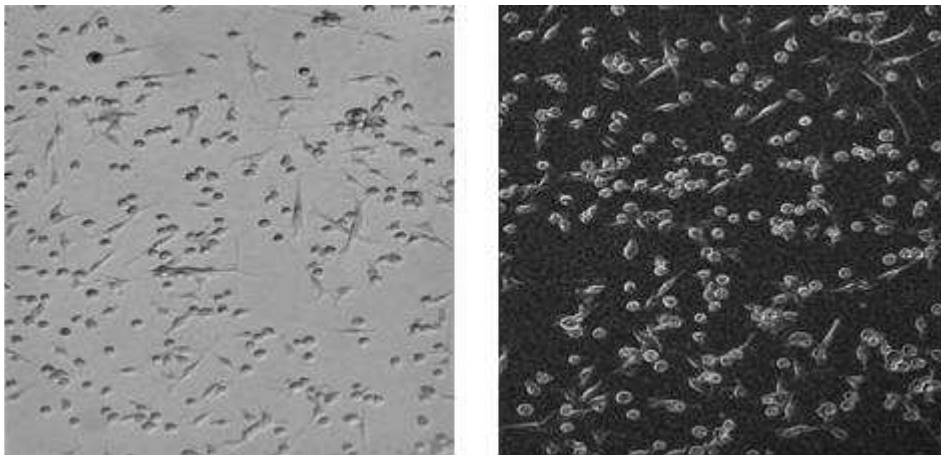


Figure n°4. Passage de l'image corrigée des niveaux de gris (à gauche) à l'image des écarts-type (à droite).

4. Détection des centres des cellules

L'image des écarts-type contient des anneaux (contour des cellules) dont l'intérieur est fortement hétérogène, ce que nous qualifions de texturé. Nous avons cherché à renforcer la visibilité de ces cellules. Pour cela nous avons conçu un filtre correspondant à la différence de deux gaussiennes inversées dont l'équation est donnée en [3] :

$$g(x, y) = -255 \cdot \left[e^{-\frac{(x-\mu_{1x})^2+(y-\mu_{1y})^2}{2\sigma_1}} - e^{-\frac{(x-\mu_{2x})^2+(y-\mu_{2y})^2}{2\sigma_2}} \right] \quad [3]$$

dans laquelle μ_{1x} , μ_{1y} , μ_{2x} et μ_{2y} représentent les coordonnées en x et y des moyennes des deux gaussiennes, et σ_1 et σ_2 , les écarts-type de ces deux gaussiennes. On pose $\sigma_1 \approx 2\sigma_2$.

Pour détecter les cellules nous pratiquons une convolution entre ce filtre, dont la réponse impulsionnelle est représentée sur la figure n°5, et l'image des écart-types.

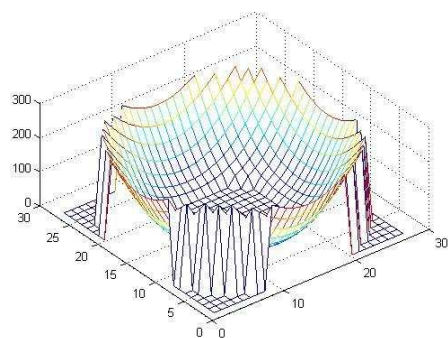


Figure n°5. Réponse impulsionnelle du filtre « Halo » (rayon égal à 15 pixels) dans l'espace image.

Le résultat de cette convolution est visible sur la figure n°6 (droite). Chaque cellule prend une allure diffuse, d'où le nom donné au filtre, avec une zone très blanche au milieu de ce halo traduisant la région dans laquelle la réponse à la convolution avec le filtre a été maximum. Chaque maximum local, en terme de niveau de gris, sera associé à un centre de cellule. Le relevé des positions en x et y de ces maxima locaux nous permet donc de repérer la position des centres des cellules dans l'image et de procéder au comptage des cellules présentes.

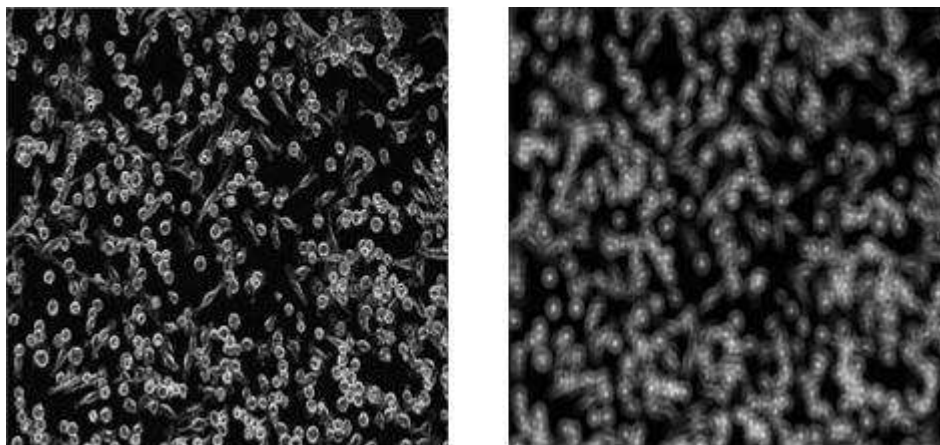


Figure n°6. A gauche : Image des écarts-type. A droite : Image obtenue après convolution avec le filtre « Halo » de rayon égal à 15 pixels.

5. Résultats du comptage et comparaison avec la méthode de Hough

La chaîne de traitements présentée dans les paragraphes précédents a permis d'extraire les centres de cellules, ce qui va servir de base au comptage du nombre de cellules présentes dans l'image, étape indispensable pour quantifier ultérieurement la proportion de chacune des classes de cellules (rondes lisses, rondes blebbantes ou allongées). Les résultats obtenus par notre approche basée sur le filtre « Halo » ont été comparés à une vérité terrain établie par un expert biologiste à travers l'analyse de d'environ 150 images, comportant plus de 65000 cellules. En parallèle nous avons également développé une approche basée sur l'utilisation de la transformée de Hough (Hough 1962). Sur l'image des écarts-type binarisée par la méthode ISODATA, nous calculons l'accumulateur de la transformée de Hough en utilisant l'algorithme de Pinzon (Pinzon et al. 2004). Les maxima locaux de l'image de cet accumulateur, qui correspondent aux centres des cellules, sont extraits de la même manière que dans la méthode utilisant le filtre « Halo ».

Le tableau n°1 donne les résultats globaux du comptage des cellules. On constate que la chaîne de traitements utilisant la transformée de Hough conduit à une meilleure précision puisque l'on trouve 94% de cellules pour un résultat de l'ordre de 86% avec le filtre « Halo ».

	Expert humain	Filtre "Halo"	Transformée de Hough
Nombre de cellules détectées	66901	57478	62898
Pourcentage de cellules détectées		85,92%	94,02%

Tableau n°1 : Comparaison des résultats du comptage des cellules dans environ 150 images par les approches : Expert humain, filtrage « Halo » et transformée de Hough.

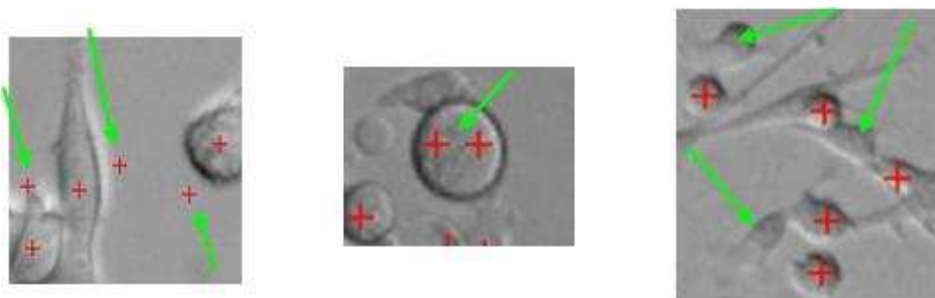


Figure n°7. Différentes erreurs pouvant se produire lors de la recherche des centres des cellules. A gauche : Fausse détection. Au centre : Détections multiples. A droite : cellules non détectées.

Pour apprécier ces résultats, il est nécessaire de conduire une analyse fine des erreurs induites par chacune des deux méthodes proposées. Trois erreurs peuvent se produire qui sont illustrées sur la figure n°7. Nous avons considéré une dizaine d'images, contenant au total plus de 5000 cellules, et nous avons comptabilisé le nombre d'erreurs commises pour chacune des deux méthodes. Dans les résultats présentés dans le tableau n°2, on constate que si le filtre « Halo » est à l'origine de peu de détections erronées ou de détections multiples, par contre il ne permet pas de détecter un nombre important de cellules. Ceci est dû vraisemblablement à la forme circulaire du filtre qui ne permet pas de détecter les cellules de morphologie allongée.

Filtre "Halo"	Détection dans le fond	Détection multiple	Cellules manquées
Nombre	0	44	1594
%	0	0,86%	31,05%
Transformée de Hough	Détection dans le fond	Détection multiple	Cellules manquées
Nombre	74	212	1328
%	1,31%	3,76%	23,54%

Tableau n°2 : Comportement des deux méthodes face aux trois problèmes identifiés comme mettant en défaut la procédure de comptage.

6. Conclusion et travaux futurs

On constate que la chaîne de traitements présentée ici permet d'obtenir des résultats intéressants pour le comptage de cellules dans des conditions d'acquisition variables. Nous travaillons actuellement sur la complémentarité des approches « Halo » et Hough. Nous développons également une procédure automatique de calcul du rayon du filtre « Halo ». Une fois l'étape de comptage jugée satisfaisante, nous travaillerons sur la classification des cellules en utilisant des paramètres morphologiques et texturaux.

Bibliographie

- Hough P. V. C., *Methods and means to recognize complex patterns*, U.S. Patent 3,069,654, 1962.
- Malo M., Charrière-Bertrand C., Chettaoui E., Fabre-Guillevin C., Mauquerlot F., Lackmy A., Vallée A., Delaplace F., Barlovatz-Meimon G., The PAI-1 swing: Microenvironment and cancer cell migration, *C. R. Biol.*, 329(12): 938-944, 2006.
- Otsu N., A threshold selection method from gray-level histograms, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1):62–66, 1979
- Pinzon R., Garavito G., Hata Y., Arteaga L. and Garcia J. D., Development of an automatic counting system for blood smears, *Proceedings of the Congress of the Spanish Biomedical Engineering Society*, pages 45–49, 2004.