The background of the slide is a dark blue, spiral-bound notebook. The spiral binding is visible at the top edge. The text is centered on the notebook page.

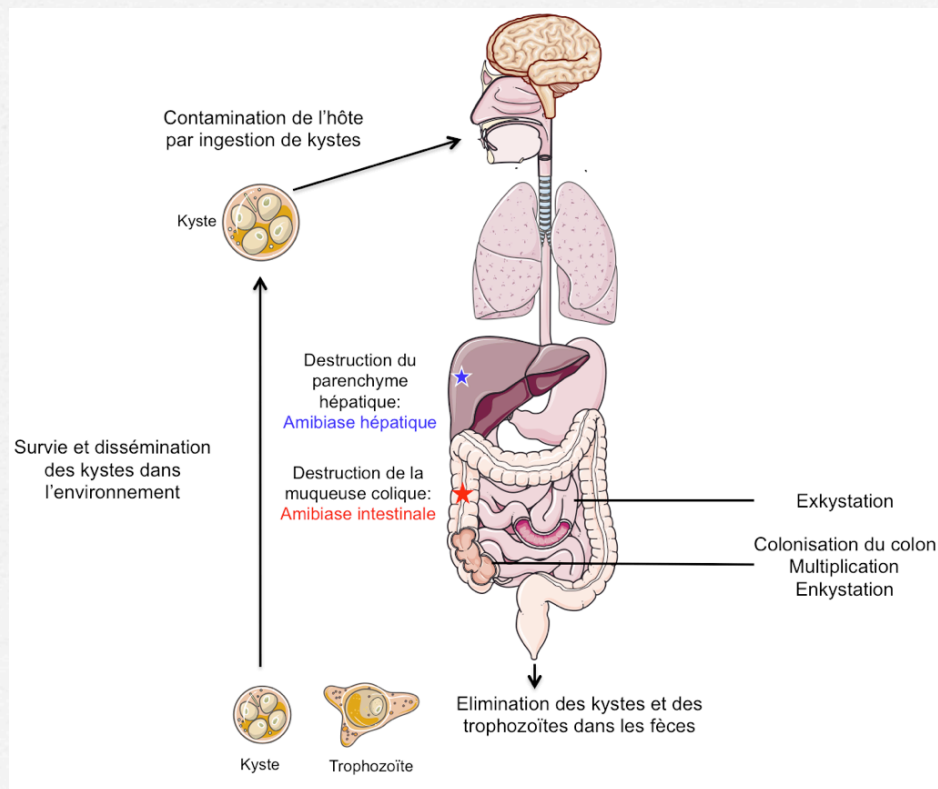
Segmentation & tracking de cellules en imagerie microscopique

Vannary Meas-Yedid
Institut Pasteur - CNRS URA 2582
Unité d'Analyse d'Image Quantitative
<http://www.bioimageanalysis.org>
vmeasyed@pasteur.fr

Motivations et objectifs

- La forme et la motilité des cellules sont des descripteurs importants de l'état de la cellule (âge, santé, cycle, etc.)
- De telles mesures ne sont pas disponibles à l'échelle de la population. La quantification à grande échelle au niveau cellulaire est nécessaire
- Les techniques modernes de microscopies permettent d'observer efficacement les cellules *in vitro* et *ex vivo* dans le temps 2D et dans l'espace 3D
- But: développer des nouveaux algorithmes et outils pour exploiter ces données de manière efficace, systématique et automatique

Contexte biologique



Dans les zones rurales, 2 à 20% des humains sont porteurs de *Entamoeba histolytica*

Amibiase

un problème de santé publique

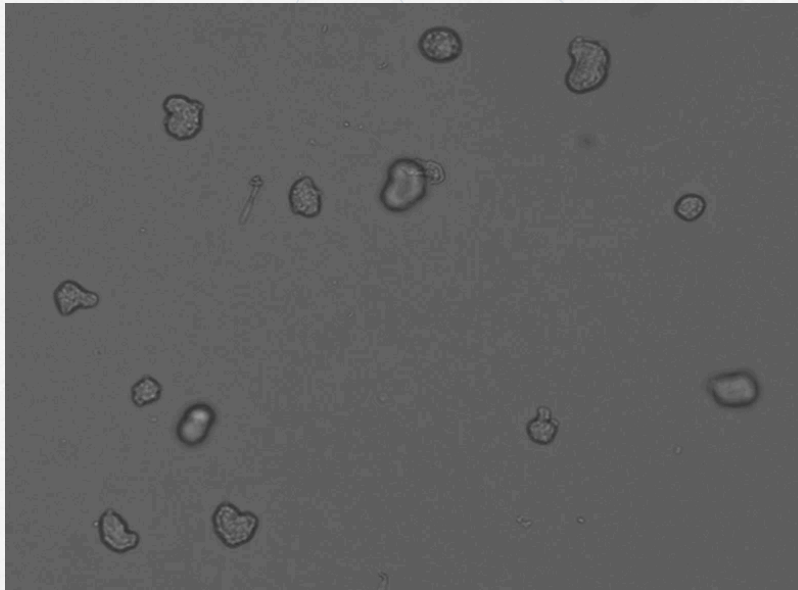
Dysenterie

Abcès

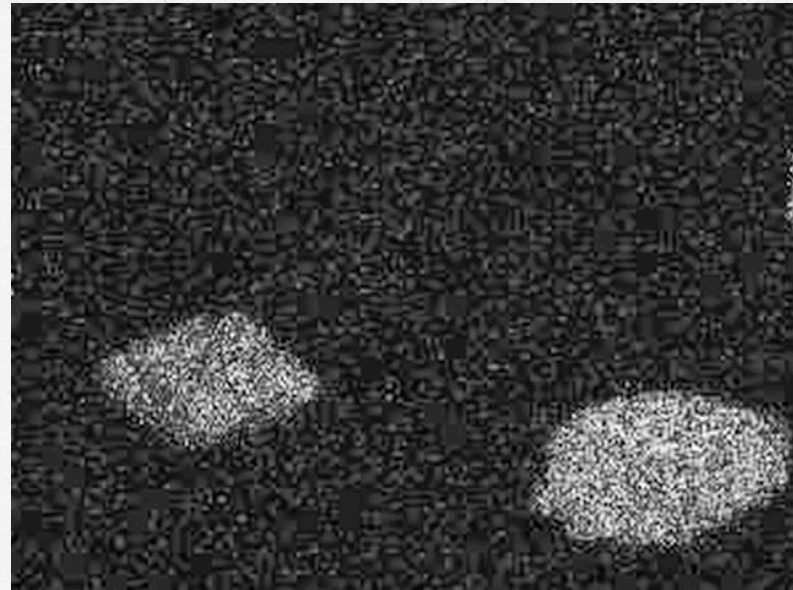
50 millions de cas 100 000 décès cliniques

Imagerie In vitro

- 2D microscopy of *Entamoeba histolytica*



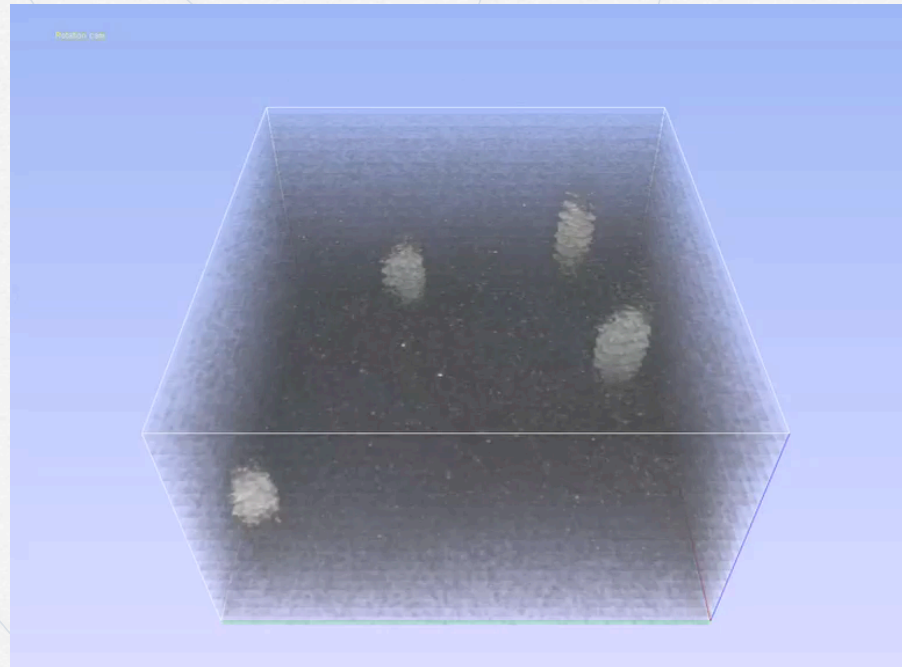
chemotaxis on glass substrate (phase-contrast)



GFP-labeling (epi-fluorescence)

Imagerie Ex vivo

- 3D microscopy of *Entamoeba histolytica*



mucus layer of human colonic barrier (2-photon)

Difficultés

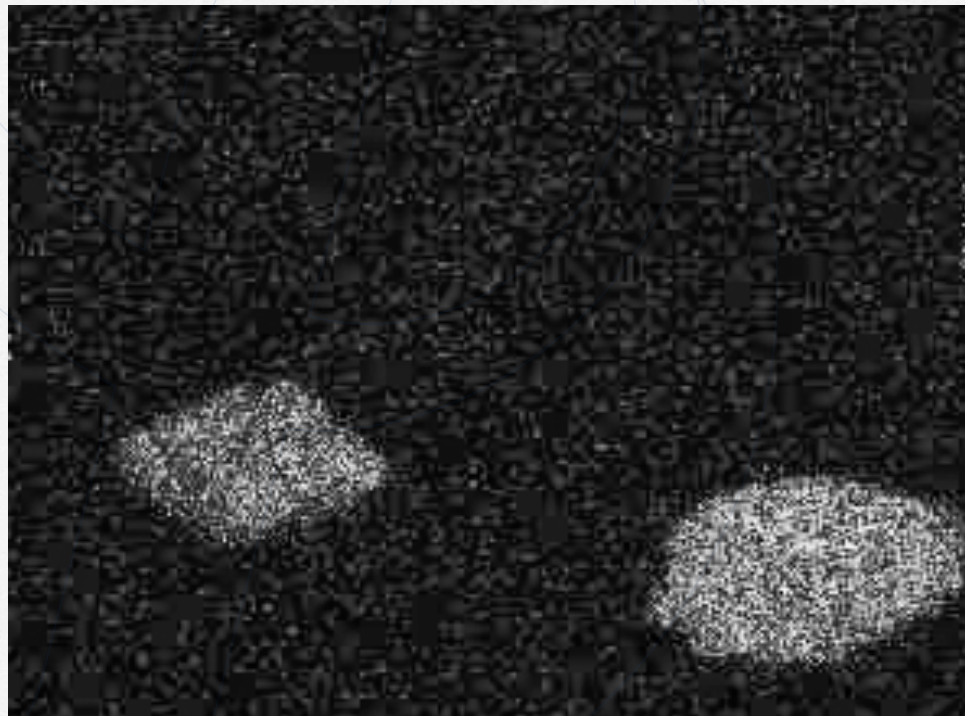
- ❑ objets de forme quelconque
- ❑ faible contraste
- ❑ cellules en aggrégat
- ❑ bruité, faible SNR
- ❑ division cellulaire
- ❑ objets sortant/entrant
- ❑ ...



Méthodes standards

- 1) Classification de Pixel (seuillage automatique)
- 2) Post-traitement (math. morphology)
- 3) Extraction d'objets

Traitement typique de la plupart des logiciels commerciaux



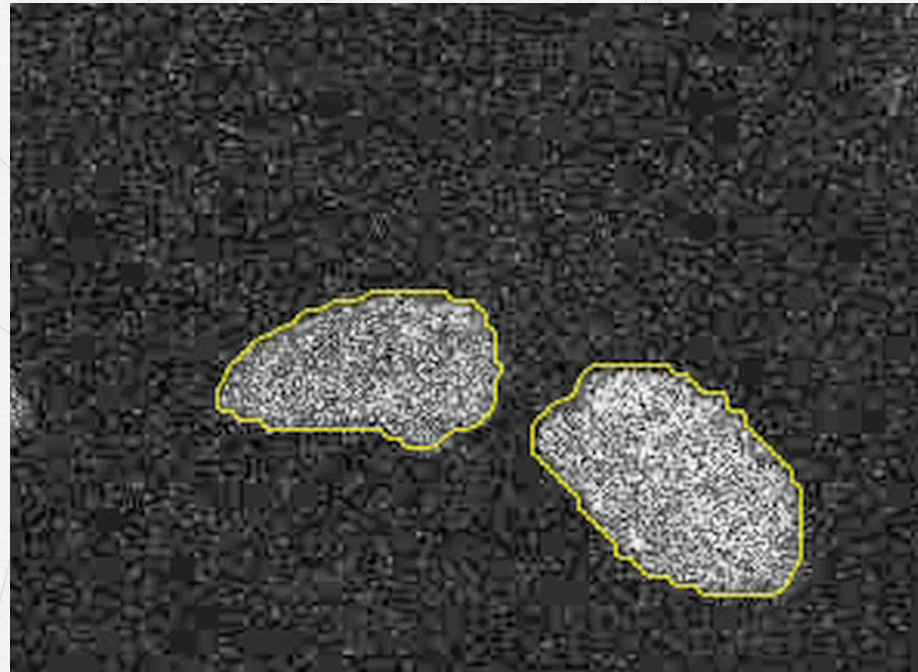
les objets qui se touchent sont confondus...

Modèles déformables : Contours actifs

- Idée: faire évoluer un contour C vers les frontières de la cellule
- La déformation est relative à la minimisation de la fonctionnelle de coût défini par l'utilisateur (comment atteindre les contours)
- Approche à base de modèle : permet toute combinaison des informations issues de l'image et des connaissances a priori pour augmenter la robustesse de la détection
- Le tracking est implicite: re-utilisation des contours obtenus de l'image en cours sur les images suivantes pour suivre les cellules dans le temps

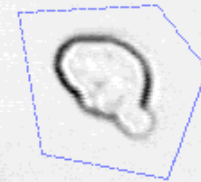
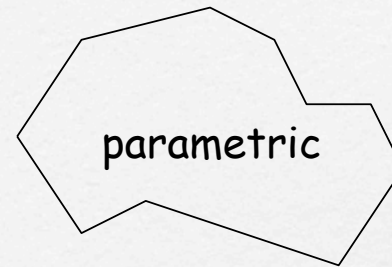
Contours actifs

- 1) Définir les contours initiaux et une fonctionnelle de cout
- 2) Laisser les contours se déformer jusqu'à stabilisation
- 3) Copier les contours pour initialiser l'image suivante
préserver l'identification des objets qui se touchent

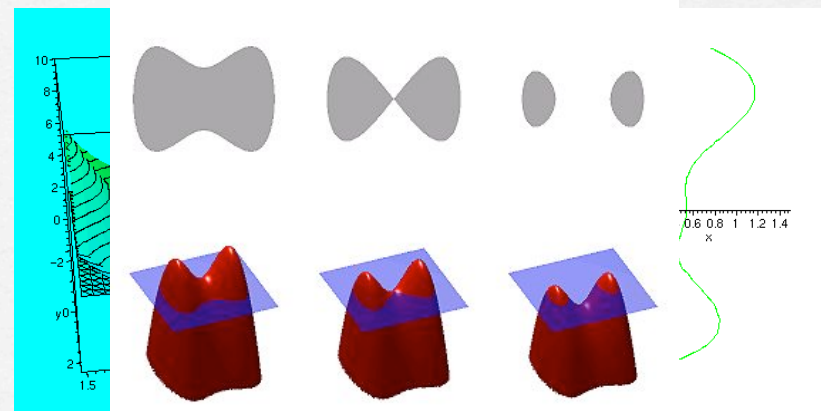
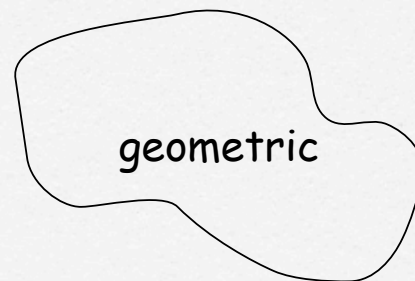


2 approches

- Snake : contours paramétriques explicites



- Level-Set : contours géométriques implicites



Snakes

Approche physique des contours (Kass, Witkin, Terzopoulos 87)

- un contour initial se déforme sous l'action de plusieurs forces :

$$E[(C)(p)] = \alpha \int_0^1 E_{int}(C(p))dp + \beta \int_0^1 E_{img}(C(p))dp + \gamma \int_0^1 E_{con}(C(p))dp$$

- L'énergie interne contrôle la régularité et l'élasticité de la courbe
- L'énergie de l'image guide le contour actif vers les propriétés désirées de l'image (gradient, zones sombres/claires, etc.)
- L'énergie externe permet de prendre en compte les contraintes définies par l'utilisateur, ou des connaissances a priori des structures à segmenter
- L'équilibre de ces termes correspond au minimum de potentiel de la fonction de coût

Composantes du snake

- L'énergie interne
$$E_{int}(C(p)) = w_{tension}(C(p)) \left| \frac{\partial C}{\partial p}(p) \right|^2 + w_{stiffness}(C(p)) \left| \frac{\partial^2 C}{\partial p^2}(p) \right|^2$$
 - le premier terme considère le contour comme une membrane
 - le second terme fait agir le contour comme une plaque mince
- l'énergie liée à l'image

$$E_{img}(C(p)) = w_{line}E_{line}(C(p)) + w_{edge}E_{edge}(C(p)) + w_{term}E_{term}(C(p))$$

$$E_{line}(C(p)) = I(C(p))$$

$$E_{edge}(C(p)) = |\nabla I(C(p))|^2$$

- Nombreuses variantes: modèles de ballon, region-snakes, etc.

Optimisation

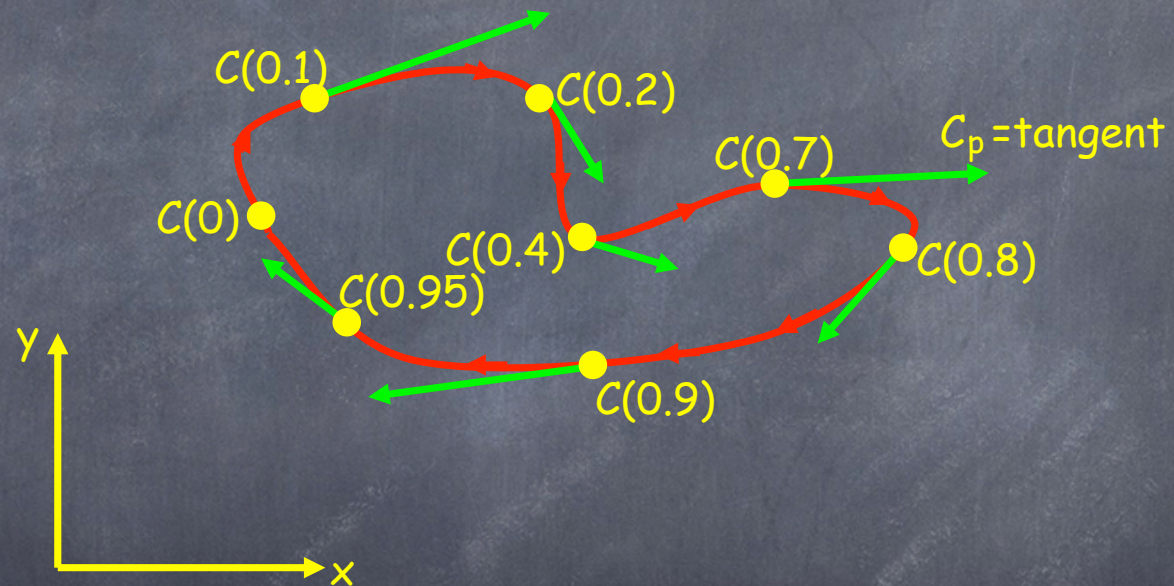
- Equation d'Euler-Lagrange:

$$\alpha \left(w_{tension} \frac{\partial^2 C}{\partial p^2}(p) - w_{stiffness} \frac{\partial^4 C}{\partial p^4}(p) \right) - \beta \nabla_{img}(C(p)) = 0$$

- Faire évoluer les positions de la courbe initiale vers les caractéristiques de l'image
 - initialiser la courbe
 - Mise-à-jour des positions des points de contrôle en résolvant l'équation ci-dessus
 - Re-paramétriser la courbe et continuer le processus jusqu'à la convergence

Discrétisation

$$C(p) = \{x(p), y(p)\}, \quad p \in [0, 1]$$



Initialisation



snake

Active Contours

Limitations of standard active contours

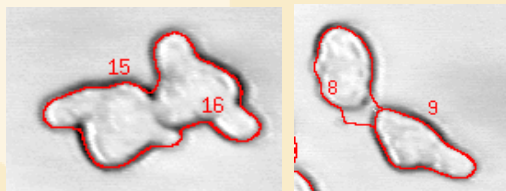
$$E(C_i) = \int_0^1 \left[\frac{1}{2} \alpha \left| \frac{\partial C_i}{\partial s}(s) \right|^2 - f(C_i(s)) \right] ds$$

$$f = |\nabla(G_\sigma * I)|$$

- Weakly contrasted membrane deformations are ignored



- Objects in contact are confused



Main improvements

$$E(C_i) = \int_0^1 \left[\frac{1}{2} \alpha \left| \frac{\partial C_i}{\partial s}(s) \right|^2 - f(C_i(s)) \right] ds + \int_0^1 \left[g \left(\bigcup_{j \neq i} C_j \right) f \right] (C_i(s)) ds$$

repulsive coupling

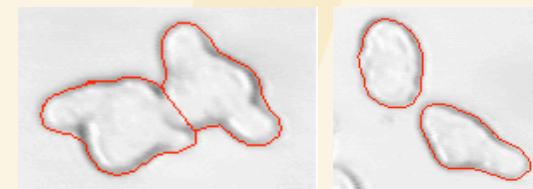
$$f = \langle |I - \langle I \rangle| \rangle \wedge I_{OM} - \lambda G_\sigma * I$$

local intensity dispersion

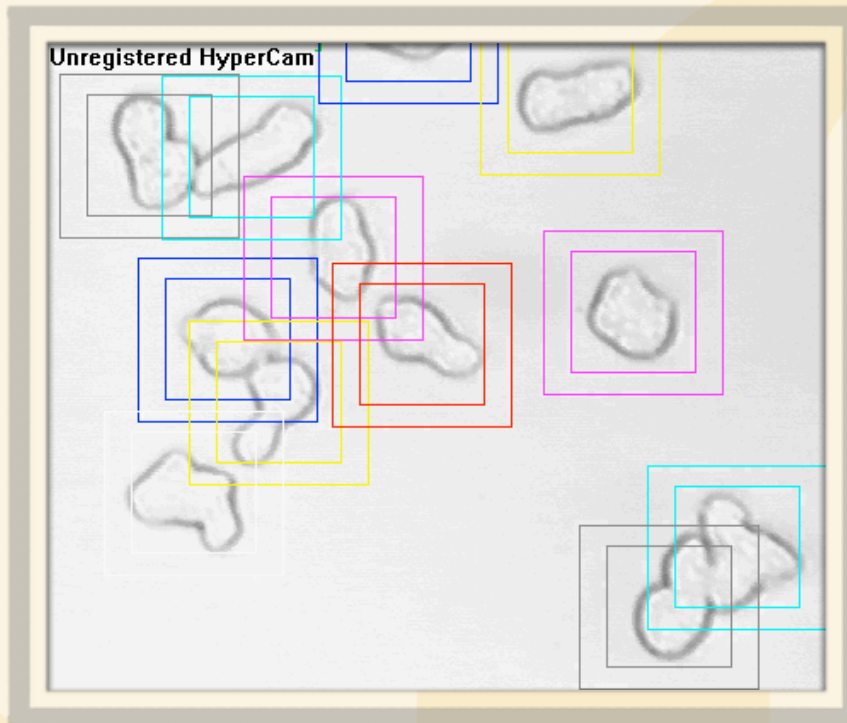
- Novel edge map based on local intensity dispersion



- Repulsive coupling of contours



Tracking deformable cells



Correlation matching (Metamorph)

Tracking fails, no segmentation



Modified active contours

Good tracking and segmentation

entamoeba histolytica

20 μ m



INSTITUT PASTEUR

Forces/faiblesses des snakes

□ Forces

- Faible complexité
- Introduction facile de connaissances a priori
- Gère aussi bien des contours ouverts que fermés

□ Faiblesses

- La sélection des paramètres et la paramétrisation du contour influencent le résultat de la segmentation
- Très sensible aux conditions initiales
- Ne permet pas de changement de topologie



Level-set

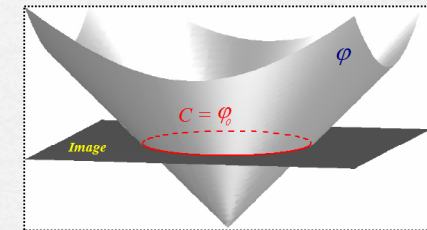
introduit dans le domaine de la dynamique des fluides (Osher-Sethian 87)

- Le problème est traité à partir d'une dimension plus grande
- La méthode de Level-set représente la courbe sous forme de surface implicite:
- Qui est dérivée à partir du contour initial selon la condition suivante:

$$\varphi(x, y, t) : \mathcal{R}^2 \times [0, T) \rightarrow \mathcal{R}$$

$$C(p, 0) = \{(x, y) : \varphi(x, y, 0) = 0\}$$

- C est décrit via le **niveau 0** d'une fonction φ d'ordre supérieur



Level-set

Choix pour φ : distance signée au front $\gamma(0)$

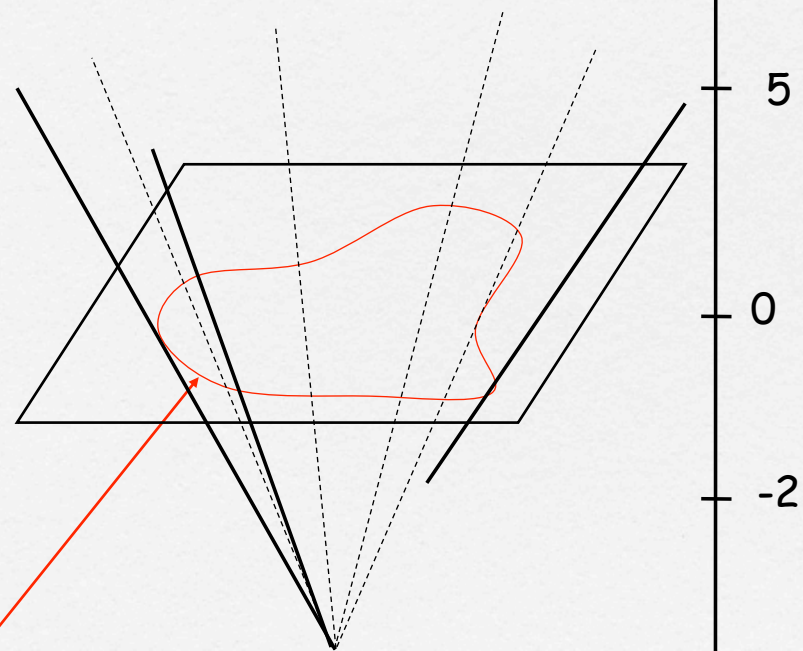
$$\varphi(x, y, 0) = \begin{cases} -d(x, y, \gamma) & \text{si } (x, y) \text{ à l'intérieur du front} \\ 0 & \text{si } (x, y) \text{ sur le front} \\ d(x, y, \gamma) & \text{si } (x, y) \text{ en dehors} \end{cases}$$

7	6	5	4	4	4	3	2	1	1	1	2	3	4	5
6	5	4	3	3	3	2	1	0	0	0	1	2	3	4
5	4	3	2	2	2	1	0	-1	-1	-1	0	1	2	3
4	3	2	1	1	1	0	-1	-2	-2	-2	-1	0	1	2
3	2	1	0	0	0	-1	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2
2	1	0	-1	-1	-1	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2	3
2	1	0	-1	-2	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
2	1	0	-1	-2	-2	-2	-2	-1	0	1	2	3	4	5
3	2	1	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	1	2	3	4	5
4	3	2	1	0	0	0	0	-1	-1	0	1	2	3	4
5	4	3	2	1	1	1	1	0	0	1	2	3	4	5
6	5	4	3	2	2	2	2	1	1	2	3	4	5	6

$\varphi(x, y, t)$

$\gamma(t)$

$\varphi(x, y, t)$



Level-set

7	6	5	4	4	4	3	2	1	1	1	2	3	4	5
6	5	4	3	3	3	2	1	0	0	0	1	2	3	4
5	4	3	2	2	2	1	0	-1	-1	-1	0	1	2	3
4	3	2	1	1	1	0	-1	-2	-2	-2	-1	0	1	2
3	2	1	0	0	0	-1	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2
2	1	0	-1	-1	-1	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2	3
2	1	0	-1	-2	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
2	1	0	-1	-2	-2	-2	-2	-1	0	1	2	3	4	5
3	2	1	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	1	2	3	4	5
4	3	2	1	0	0	0	0	-1	-1	0	1	2	3	4
5	4	3	2	1	1	1	1	0	0	1	2	3	4	5
6	5	4	3	2	2	2	2	1	1	2	3	4	5	6

$\varphi(x,y,t)$

$$\varphi(x,y,t+1) = \varphi(x,y,t) + \Delta \varphi(x,y,t)$$

• pas de mouvement, mais des valeurs qui changent

- le front d'onde peut changer sa topologie
- la position du front d'onde peut être entre plusieurs objets

7	6	5	4	4	4	3	2	1	1	1	2	3	4	5
6	5	4	3	3	3	2	1	0	-1	0	0	1	2	3
5	4	3	2	2	2	1	0	-1	-2	-1	-1	0	1	2
4	3	2	1	1	1	0	-1	-2	-2	-2	-1	0	1	2
3	2	1	0	0	0	-1	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2
2	1	0	-1	-1	-1	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2	3
2	1	0	-1	-2	-2	-3	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
2	1	1	0	-2	-2	-2	-2	0	0	1	2	3	4	5
3	2	1	0	-1	-3	-1	0	1	1	1	2	3	4	5
4	3	2	0	-1	-2	0	1	1	0	0	2	2	3	4
5	4	3	2	0	0	1	1	0	-1	0	1	2	4	5
6	5	4	3	2	1	2	2	0	0	1	2	4	5	6

Segmenter avec les level-sets

- Initialiser le front $\gamma(0)$

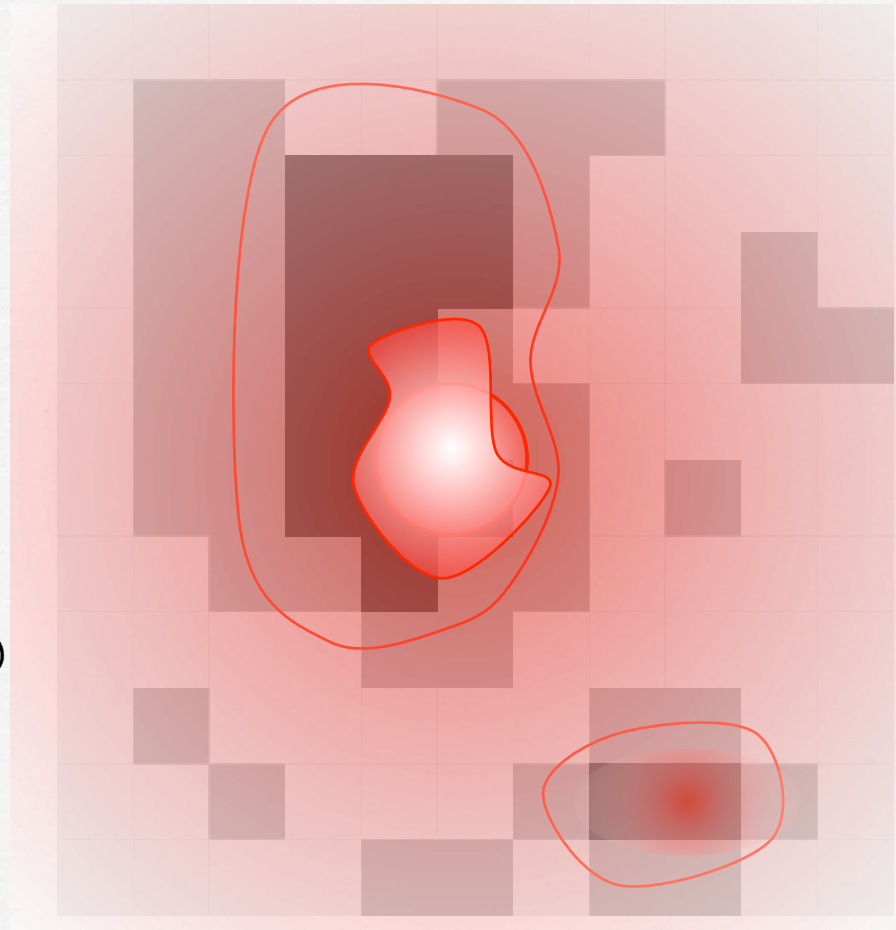
- calculer $\varphi(x,y,0)$

- Itérer:

$$\varphi(x,y,t+1) = \varphi(x,y,t) + \Delta \varphi(x,y,t)$$

jusqu'à convergence

- Marquer le front $\gamma(t_{end})$



Level-set: forces/faiblesses

☐ Forces

- ☐ Outil élégant pour suivre des interfaces en mouvement
- ☐ Gère le changement de topologie (division cellulaire)
- ☐ Détecte les objets entrant

☐ Faiblesses

- ☐ Forte complexité, Temps de calculs important
- ☐ Approximations numériques
- ☐ Confusion pour des objets proches

De nombreuses variantes

- Geodesic active contour/region
- Gradient Vector Flow
- Multi-phase
- Shape Prior
- ...

Paragios



Cell Shape and Motility

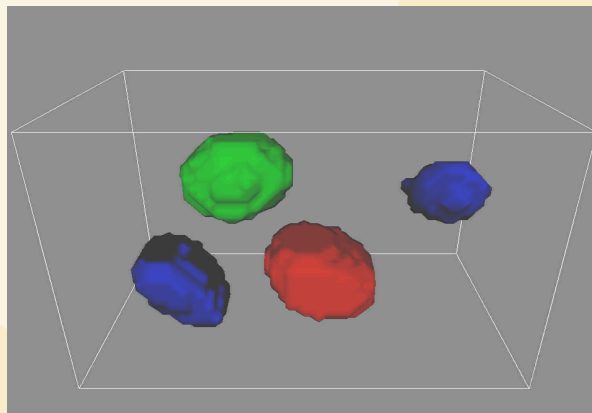
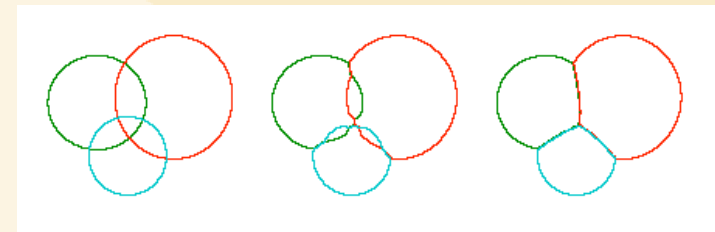


Tracking deformable cells in 3D+t

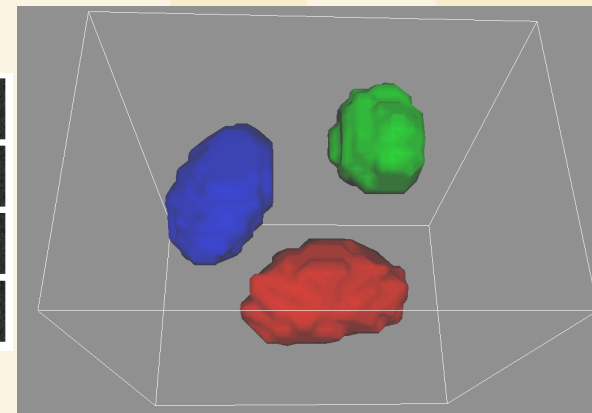
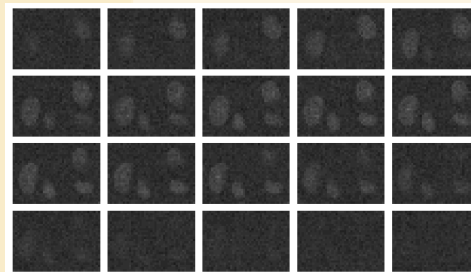
- One level set function for *each* object with a penalty for overlaps:

$$E(\phi_1, \dots, \phi_n, c_O, c_{I,1}, \dots, c_{I,n}) = \iiint_{\Omega} \sum_{i=1}^n \left[\alpha g \delta(\phi_i) |\nabla \phi_i| \right. \\ \left. + \lambda_I H(\phi_i) (I - c_{I,i})^2 \right. \\ \left. + \frac{\lambda_O}{n} \prod_j (1 - H(\phi_j)) (I - c_O)^2 \right. \\ \left. + \gamma \sum_{i < j} H(\phi_i) H(\phi_j) \right] dxdydz$$

Penalty for surface overlaps



Handling touching cells

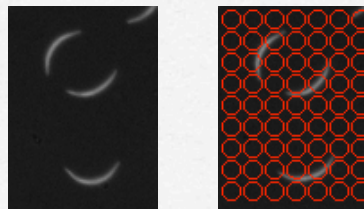


Handling cell division

Dufour, A., Tashbacsh, S., Guillén, N., Olivo-Marin, J.-C., Zimmer, C., *IEEE Trans. Image Processing* (2005)



Initialisation



Level-set

3D-Active Meshes

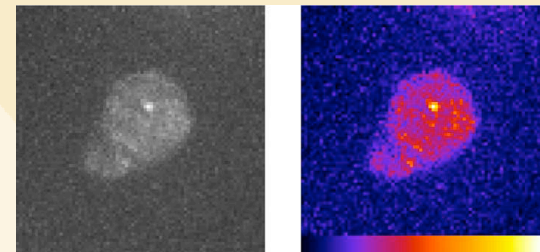
- \mathcal{M} surface discrète définie par une liste de noeud 3D $v_i = (x_i, y_i, z_i)$ dans $\Omega \in R^3$
- Les noeuds sont reliés pour former un triangle (ensemble fermé, orienté), appelé facette
- Re-paramétrisation efficace
- Gestion des opérations topologiques

$$\Omega \in R^N \mapsto [0, 1]$$

$$E(R_{0\dots n}, C_{1\dots n}) = \lambda_0 \int_{R_0} |I - c_0|^2 d\Omega$$

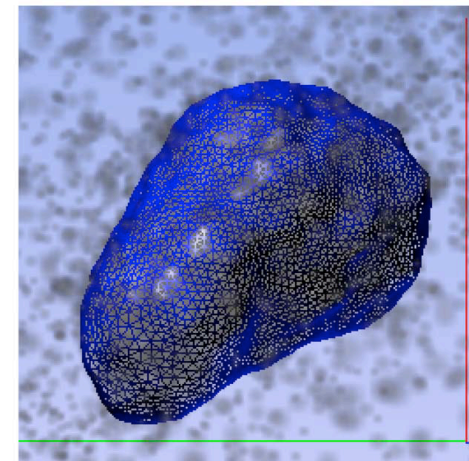
$$+ \sum_{i=0}^n \left[\mu \oint_{C_i} g_I dC + \lambda_1 \int_{R_i} |I - c_i|^2 d\Omega \right.$$

$$\left. + \gamma \sum_{j=i+1}^n \oint_{R_i \cap R_j} d\Omega + \eta \left(\int_{R_i} d\Omega - A_i \right)^2 \right]$$



(a)

(b)



(c)

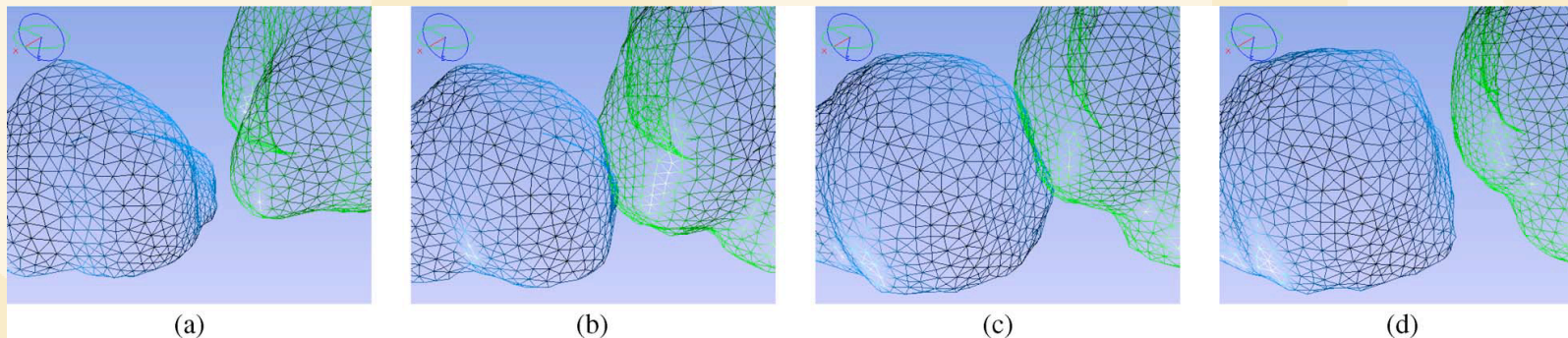
Dufour, A., Thibeaux R., Labruyère E., Guillén, N., Olivo-Marin, J.-C. *IEEE Trans. Image Processing* (2011)



INSTITUT PASTEUR

3D-Active Meshes

- Calculs dans le domaine discret
 - gain de mémoire et de temps de calculs
- Minimisation des fonctionnelles d'énergie
- Exploitent de nombreuses optimisations issues du computer graphic



Dufour, A., Thibeaux R., Labruyère E., Guillén, N., Olivo-Marin, J.-C. *IEEE Trans. Image Processing* (2011)

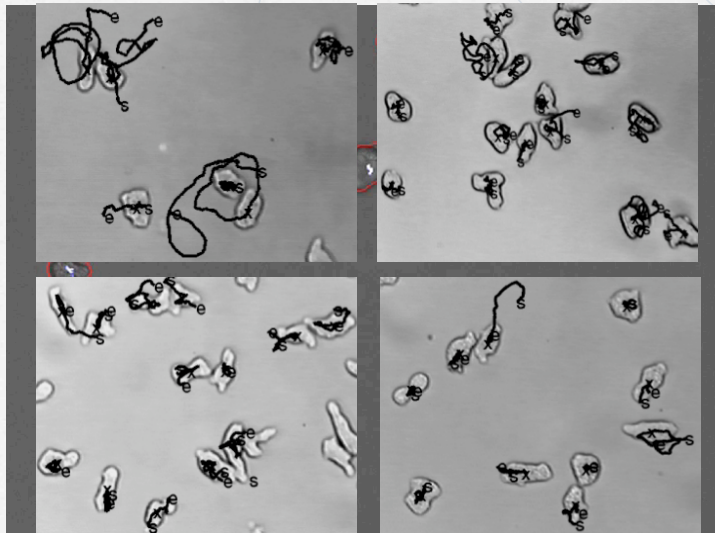


INSTITUT PASTEUR

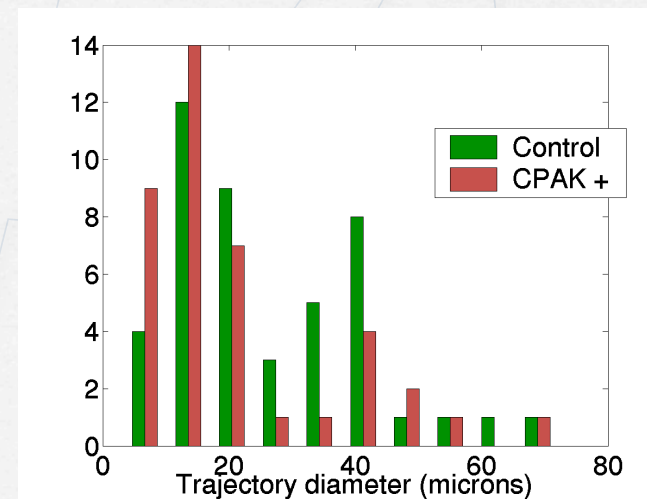
Applications (I)

- 2D phase-contrast microscopy

➔ Motility distribution of *E. histolytica* cells

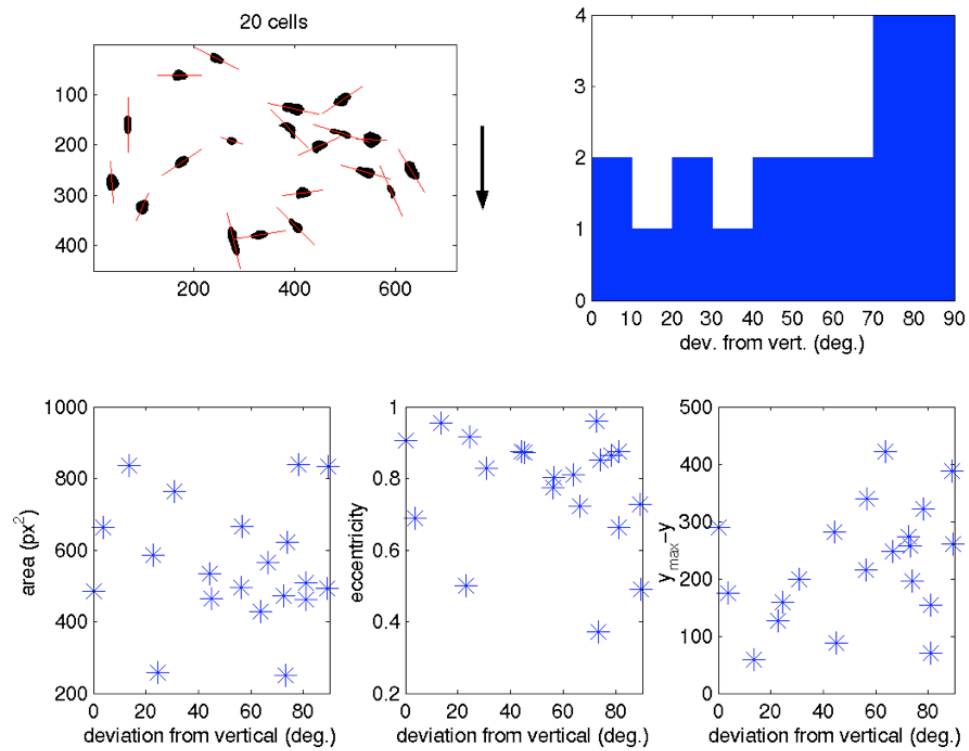


↔ diameter
Trajectory

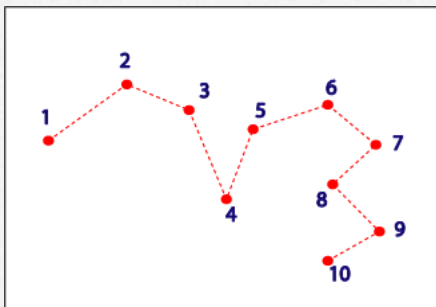


Applications (I)

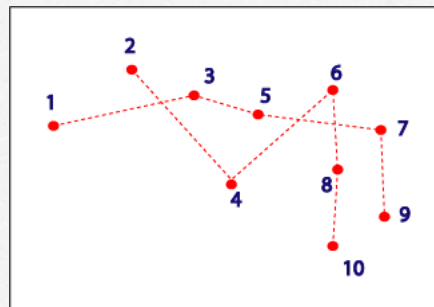
Analyse de l'orientation



Analyse des trajectoires: Mean Square Displacement (MSD)



déplacements
quadratiques moyen
pendant Δt

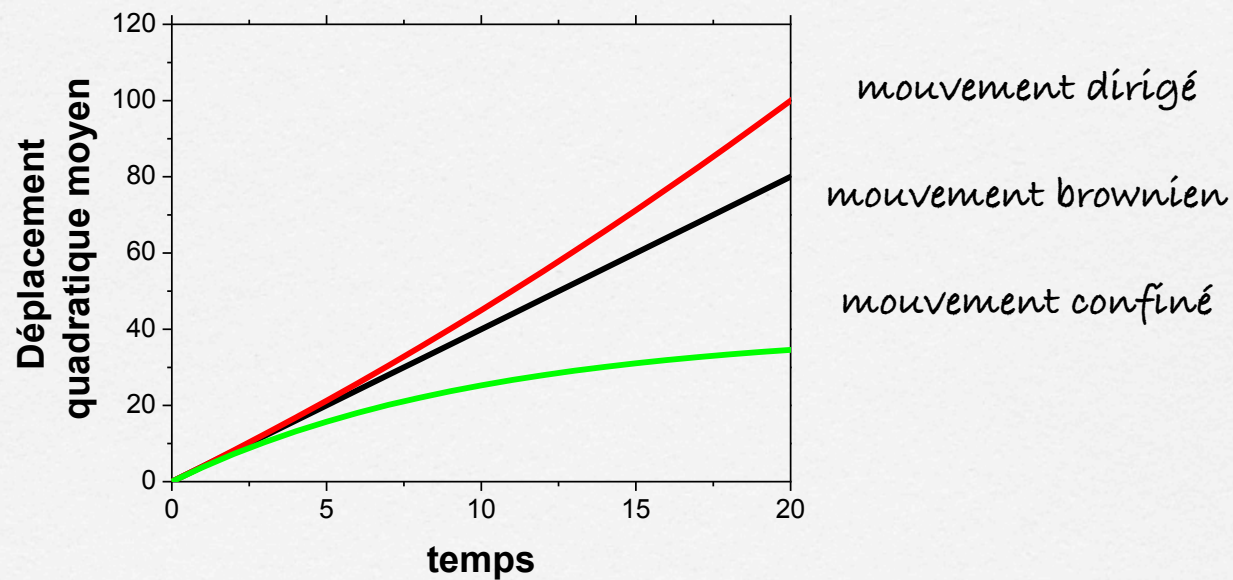


$$MSD(m) = \langle |r(t) - r|^2 \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |r(m+i) - r(i)|^2$$

m : nombre maximum de points permis pour le calcul du MSD

n : nombre de points pour moyenner

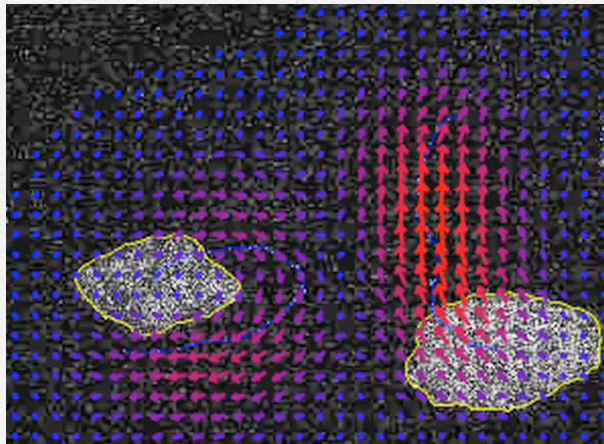
Analyse des trajectoires: Mean Square Displacement (MSD)



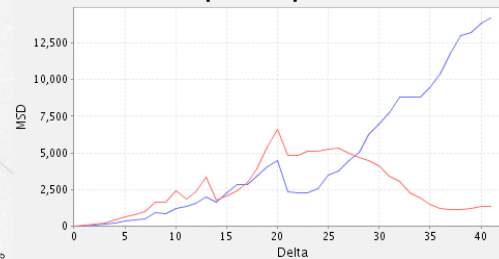
Applications (II)

● 2D fluorescence microscopy

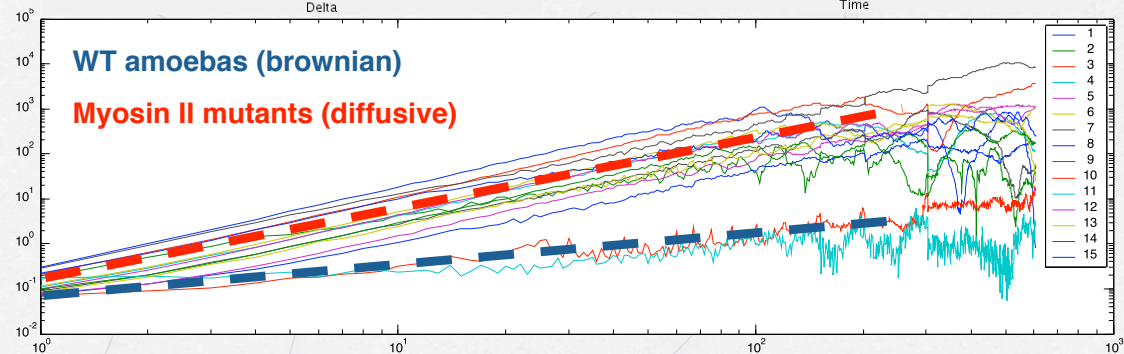
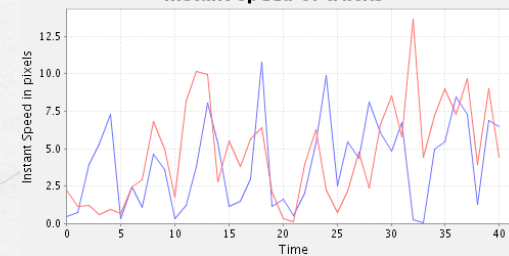
➡ Motion nature determination



Mean Square Displacement



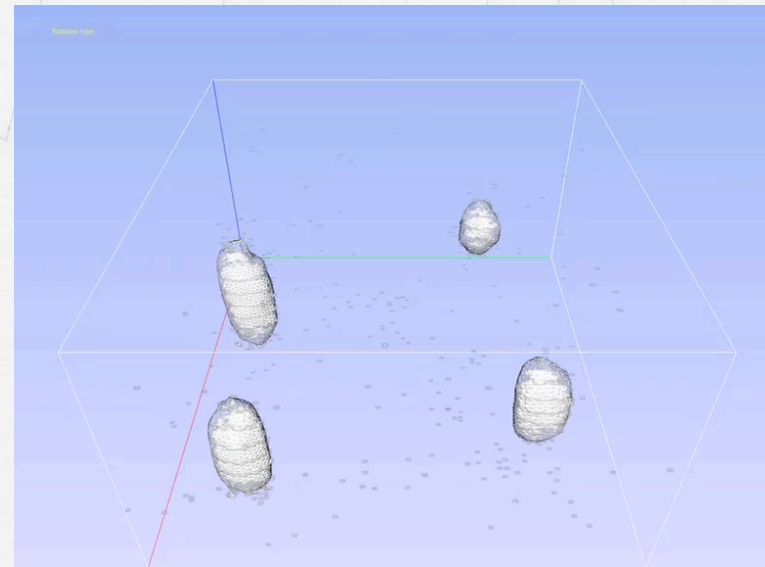
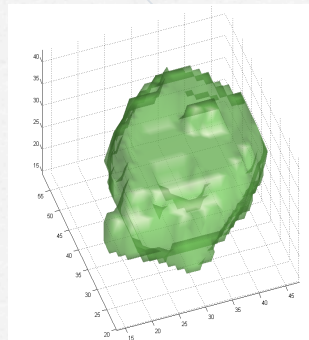
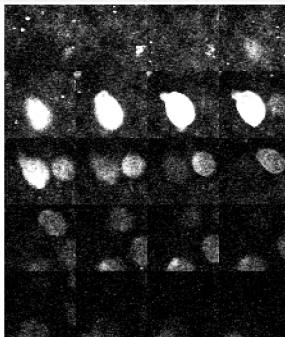
Instant Speed of tracks



Applications (III)

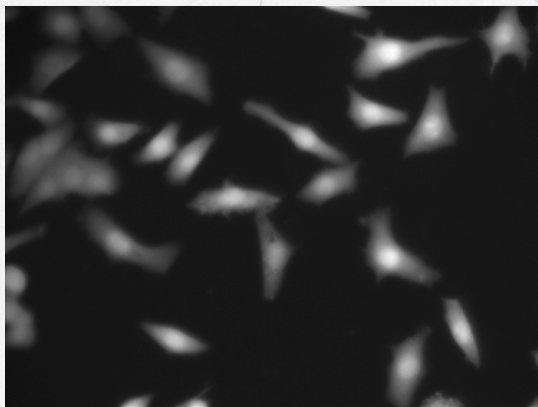
- 3D fluorescence microscopy

➔ Study of 3D shape and motility

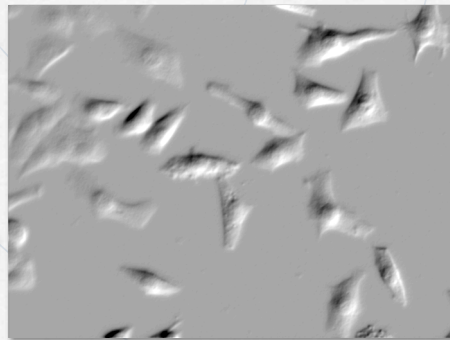


Other applications

➡ Segmentation of clustered cells



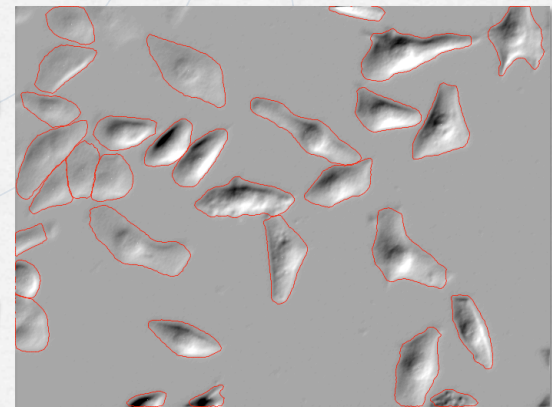
HEK cells labeled with HCS CellMask



Intensity gradient map



Automated nuclei extraction



Detection results

References

- C. Zimmer et al., Segmentation and tracking of migrating cells in videomicroscopy with parametric active contours : a tool for cell-based drug testing, IEEE Transactions on Medical Imaging, 21(10), 2002
- A. Dufour et al., Segmenting and tracking fluorescent cells in dynamic 3-D microscopy with coupled active surfaces, IEEE Transactions on Image Processing, 14(9), 2005
- C. Zimmer et al., On the digital trail of mobile cells, IEEE Signal Processing Magazine, 23(5), 2006
- A. Dufour et al., Automated quantification of cell endocytosis using active contours and wavelets, IAPR International Conference on Pattern Recognition, Tampa (FL), 8–11 Dec. 2008
- A. Dufour et al., 3-D Active Meshes: Fast Discrete Deformable Models for Cell Tracking in 3-D Time-Lapse Microscopy, IEEE Transactions on Image Processing, 14(9), 2011

Many thanks to

The AIQ team:

- Jean-Christophe Olivo-Marin
- Alexandre Dufour
- Christophe Zimmer

Collaborators:

- Nancy Guillén et al. (Biology of cell parasitism)
- Alice Dautry et al. (Biology of cell interactions)