Colocalisation

V. Meas-Yedid Quantitative Image Analysis Unit

Institut Pasteur, France

## **Motivations et objectifs**



- Les techniques modernes de microscopies permettent d'observer efficacement divers compartiments cellulaires et entités intracellulaires (vésicules, endosomes, virus, etc.)
- Etude de la dynamique d'objets biologiques en microscopie 2D/3D+t
- But : fournir des méthodes permettant de
  - gérer la grande variabilité des données biologiques
  - augmenter la sensibilité et la spécificité de l'analyse
  - fournir des résultats robustes, quantitatives et reproductibles



## Problématique

H



#### Difficultés:

- aspect difficilement modélisable
- très bruité, faible SNR
- nombre élevé d'objets
- penvent apparaître/ dísparaître
- peuvent s'agglomérer

## Tracking bayesien



#### Détection

- Pour obtenir des mesures des objets
- Filtrage bayesien
  - Pour créer des prédictions puis des estimations des objets

#### Association

 Pour déterminer quelle mesure provient de quel objet, si elle provient d'un objet

## Détection

objectif : produíre des mesures des objets



Détection de taches fluorescentes [Olivo-Marin:2002] [Cuartero:2001] [Zhang:2003]

#### Spot Detection by Wavelet Transform Features of the wavelet transform • Based on the convolution of the signal with a family of functions derived from a "mother" function by translation and dilation x 10 x 10 Gaussian Function Wavelet Coefficients 25 2 1.5 Value /alue 2 a 6 0.5 0.5 04 0.4 200 200 150 100 100 100 50 0/2 x 0.3 x 10 x 10 Absolute Values Positive Coefficients $0.2 \pm$ 0.1 Û 2 -2 /alue v /alue B2 - wavelet function B2 - scale function 208 200 100 100 100 50 50 0 0 0 0

• Analysis tool that cuts up data into different frequency components and studies each with a resolution adapted to its scale

7



Original



l st scale

2nd scale



**3rd scale** Olivo-Marin, J.-C., *Pattern Recognition* (2002)

# Spot Detection

















Feature Adapted Detection with Wavelet Transform



Estímation «optimale» à partir des mesures

## Filtre de Kalman

- Algorithme récursif de traitement de données
- Génère un estímé optimal des quantités désirées à partir d'un ensemble de mesures

F

1

- > Optimal?
  - Pour un système línéaire avec du bruit blanc gaussien, le filtre de Kalman est le 'meilleur' estimé
  - > pour un système non linéaire, l'optimalité est 'qualifié'
- Récursif?
  - Ne nécessite que de connaitre que les précédentes mesures



- Variance de l'erreur dans l'estimée:  $\sigma_x^2(t_1) = \sigma_{z_1}^2$
- Objet à la même position au temps t<sub>2</sub> position prédite est z<sub>1</sub>



- Mesure au temps  $t_2$ : Moyenne =  $z_2$  and Variance =  $\sigma_{z2}$
- Correction de la prédiction en intégrant la mesure pour avoir  $\hat{y}(t_2)$
- Proche de mesure plus fiable interpolation linéaire?







- Au temps t<sub>3</sub>, l'objet bouge avec une vitesse dy/dt=u
- Approche naïve : probabilité de translation à droite pour la prédiction
- Cela ne fonctionne que si nous connaissons exactement la vitesse (modèle parfait)

## Filtre de Kalman



- Il vaut mieux supposer un modèle imparfait (+bruit Gaussien)
- dy/dt = u + w
- La distribution de la prédiction bouge et s'étale



• Si nous prenons une mesure au temps t<sub>3</sub>

.

• Il faut corriger encore une fois la prédiction

- Initial conditions ( $\hat{y}_{\text{k-1}} \, \text{and} \, \sigma_{\text{k-1}})$
- Prediction ( $\hat{y}_k, \sigma_k$ )
  - Use initial conditions and model (eg. constant velocity) to make prediction
- Measurement (z<sub>k</sub>)
  - Take measurement
- Correction ( $\hat{y}_k$  ,  $\sigma_k$ )
  - Use measurement to correct prediction by 'blending' prediction and residual – always a case of merging only two Gaussians
  - · Optimal estimate with smaller variance



• Process to be estimated:

 $y_k = Ay_{k-1} + Bu_k + w_{k-1}$  Process Noise (w) with covariance Q

 $z_k = Hy_k + v_k$  Measurement Noise (v) with covariance R

#### Kalman Filter

Predicted:  $\hat{y}_{k}$  is estimate based on measurements at previous time-steps

$$\hat{\mathbf{y}}_{\mathbf{k}}^{-} = \mathbf{A}\mathbf{y}_{\mathbf{k}-1} + \mathbf{B}\mathbf{u}_{\mathbf{k}}$$
  
 $\mathbf{P}_{\mathbf{k}}^{-} = \mathbf{A}\mathbf{P}_{\mathbf{k}-1}\mathbf{A}^{\mathsf{T}} + \mathbf{C}$ 

Corrected:  $\hat{y}_k$  has additional information – the measurement at time k

$$\hat{y}_{k} = \hat{y}_{k}^{-} + K(z_{k}^{-} - H \hat{y}_{k}^{-})$$
  
 $K = P_{k}^{-}H^{T}(HP_{k}^{-}H^{T} + R)^{-1}$   
 $P_{k} = (I - KH)P_{k}^{-}$ 

15

Correction (Measurement Update) Prediction (Time Update) (1) Compute the Kalman Gain  $\mathbf{K} = \mathbf{P}_{\mathbf{k}}^{-} \mathbf{H}^{\mathrm{T}} (\mathbf{H} \mathbf{P}_{\mathbf{k}}^{-} \mathbf{H}^{\mathrm{T}} + \mathbf{R})^{-1}$ (1) Project the state ahead  $\hat{y}_{k} = Ay_{k-1} + Bu_{k}$ (2) Update estimate with measurement  $z_k$ (2) Project the error covariance ahead  $\hat{y}_{k} = \hat{y}_{k} + K(z_{k} - H \hat{y}_{k})$  $P_k^- = AP_{k-1}A^T + Q$ (3) Update Error Covariance  $P_k = (I - KH)P_k^-$ 



Obtenír la densíté de probabilité d'un vecteur d'état y<sub>t</sub> récursivement depuis :

- les vecteurs de mesure  $\mathbf{Z}_{1},..,\mathbf{Z}_{t}$ .
- La vraisemblance  $p(\mathbf{z}_t | \mathbf{y}_t)$ .
- L'a priori temporel  $p(\mathbf{y}_t | \mathbf{y}_{t-1})$

Donc:

• obtenir  $p(\mathbf{y}_t | \mathbf{z}_1, ..., \mathbf{z}_t)$  depuis  $p(\mathbf{y}_{t-1} | \mathbf{z}_1, ..., \mathbf{z}_{t-1})$ 

#### Proposition 1 : Modèle d'état



#### Modèle d'état proposé



Une fenêtre de recherche peut être obtenue avec les KF, EKF et IMM

Exemple avec un Filtre de Kalman :

$$\mathbf{z}_{t/t-1} = \mathbf{H}_{t} \mathbf{F}_{t} \mathbf{x}_{t-1/t-1}$$

$$\mathbf{S}_{t} = \mathbf{H}_{t} \mathbf{Q}_{t} \mathbf{F}_{t} \mathbf{P}_{t-1/t-1} \mathbf{F}_{t}^{T} \mathbf{H}_{t}^{T} + \mathbf{R}_{t}$$

$$Pr > 95\% \text{ avec } N(\mathbf{z}_{t}; \mathbf{z}_{t/t-1}, \mathbf{S}_{t})$$

Proposition 2 : une mise à jour de Q<sub>t</sub> qui adapte la fenêtre de recherche

## Adaptation de fenêtre de recherche

endosomes





#### Détection

- Pour obtenir des mesures des objets
- Filtrage bayesien
  - Pour créer des prédictions puis des estimations des objets

#### Association

 Pour déterminer quelle mesure provient de quel objet, si elle provient d'un objet









### Tracking multi-objets en pratique

Toutes ces méthodes font l'hypothèse suivante :

 ML
 JPDA
 une mesure est produite par un objet au plus
 un objet produit au plus une mesure

Dans la plupart des applizations, centientles en est des X<sup>A</sup>, X<sup>B</sup> validées, conduisant à l'echec de ces méthodes



#### Détection fusionnée et détection partielle





Séparation des détections conflictuelles

Détections non conflictuelles et séparées

Toutes les fusions possibles pour i

$$D^{ji_1},...,D^{ji_q} = s_q(D^j, \mathbf{z}_{t/t-1}^{i_1},...,\mathbf{z}_{t/t-1}^{i_q})$$

$$Z'_{i} = \{ \mathbf{z}(m_{q}(e^{j}, \mathbf{z}^{i}_{t/t-1})), e^{j} \in \mathcal{P}(E'_{i}) \}$$

 $Z' = \bigcup Z'$ 

Toutes les fusions possibles (ensemble des mesures virtuelles)

 $Z' \times ... \times Z' \supset \Theta$  contient des "événements réalisables d'association joints" approximés pour les x<sup>1</sup>,...,x<sup>N</sup>

 $E' = N \cup \bigcup D^{ji}$ 

$$\theta^* = \arg \max_{\theta \in \Theta} P(\theta / \mathbf{Z}_{1:t}) \qquad [\text{ dépends du choix de s(.) et m(.)} \\ \theta^* = \arg \max_{\theta \in \Theta} \frac{1}{c} \frac{\phi!}{V^{\phi}} \prod_{j} (\Lambda_{i_j j})^{\tau_j} \prod_{i} \left\{ P_D^i \right\}^i \left( 1 - P_D^i \right)^{-\delta_i} ]$$



#### Complexité : implémentation « naïve »



 $2^3 \times 2^5 \times 2^5 \times 2^5 \times 2^3 \times 2^7 \times 2^4 \times 2^5 = 2^{37} = 137.438.953.472$ 

#### Complexité : implémentation « globale »



 $2^2 + 2^3 + 2^2 + 2^2 + 2^2 + 2^3 + 2^2 + 2^3 = 44$ 



#### Spot Detection and Tracking Robustness to missing detections Robustness to density (100 x 100 x 50 sequences) 10 spots 25 spots 50 spots ٠ . • Recovery by prediction 97.5 % 85 % 63 % success success success

Genovesio, A, and Olivo-Marin, J.-C., SPIE (2003)

# Limitations

#### Golgi units tracking in Hela cells



Instantaneous Maximum Likelihood (IML) tracking



MHT prenant en compte le futur

N. Chenouard, phD, 2009

Chenouard et al., Multiple Hypothesis Tracking for Cluttered Biological Image Sequences, PAMI 2013



QDs particles motility in HeLa cells

## **Application in 3D + t**



#### **HIV exhibits four types of movements**

		Туре	Velocity	3D tracks	Movement characteristics	
	Mouvement I	Microtubule-directed	peaks at 0.1 to 1 $\mu$ m/s	20 µm	Directed	
	Mouvement II	Actin-directed	under 0.03 <i>µ</i> m/s	10 µm	Directed	
	Mouvement III	Docking at the nuclear membrane	under 0.03 <i>µ</i> m/s <sub>"</sub>	30' Jum	Confined	
	Mouvement IV	Intranuclear movement	under 0.005 <i>µ</i> m/s <sub>*</sub>	30' 1.5 µm	Diffusive	
	N. Arhel, A. (	Genovesio, JC. Oliv <u>o-M</u>	larin, S. Shorte, P. Charnea	u, Nature Methods (20	006)	
HIV	HIV dynamics in HeLa cells					

# Applications

#### □ Tracking KORI compartments in plant cells





Original 3D movie.

Particles only movie after source separation and tracking.

\*Chenouard et al., Morphological source separation for particle tracking in complex biological environments, ICPR, 2008. \*Chenouard et al., Particle tracking in fluorescent microscopy images improved by morphological source separation, ICIP 2009

#### References

## Many thanks to

The AIQ team:

- Jean-Christophe Olivo-Marin
- N. Chenouard
- A. Genovesio
- Chenouard et al., Multiple Hypothesis Tracking for Cluttered Biological Image Sequences, PAMI 2013