

Segmentation d'Images 3D de Microscopie Biphoton

Site :
Laboratoires Pierre Fabre,
Hôtel Dieu Saint Jacques,
Toulouse



Plan

- I - Thème du Stage
- II - Contenu du stage
- III – Conclusion
- IV - Questions

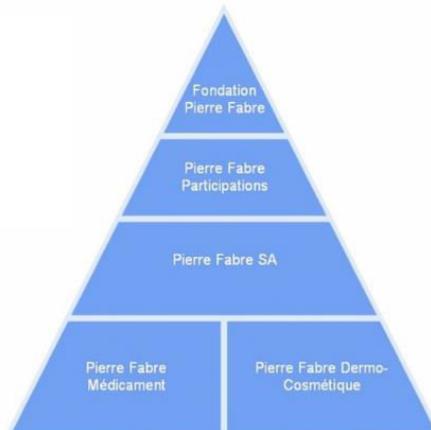




I – Thème du Stage

1/ Cadre

- Pierre Fabre : Inventeur de la Dermo-Cosmétique ;
- Groupe fondé en 1961 à Castres (Tarn) ;
- Organisation :
- Répartition mondiale :



- Différentes marques de produits : *Glytone, Avène, Ducray, A-Derma, Elancyl, Galénic, Klorane et René Furterer.*

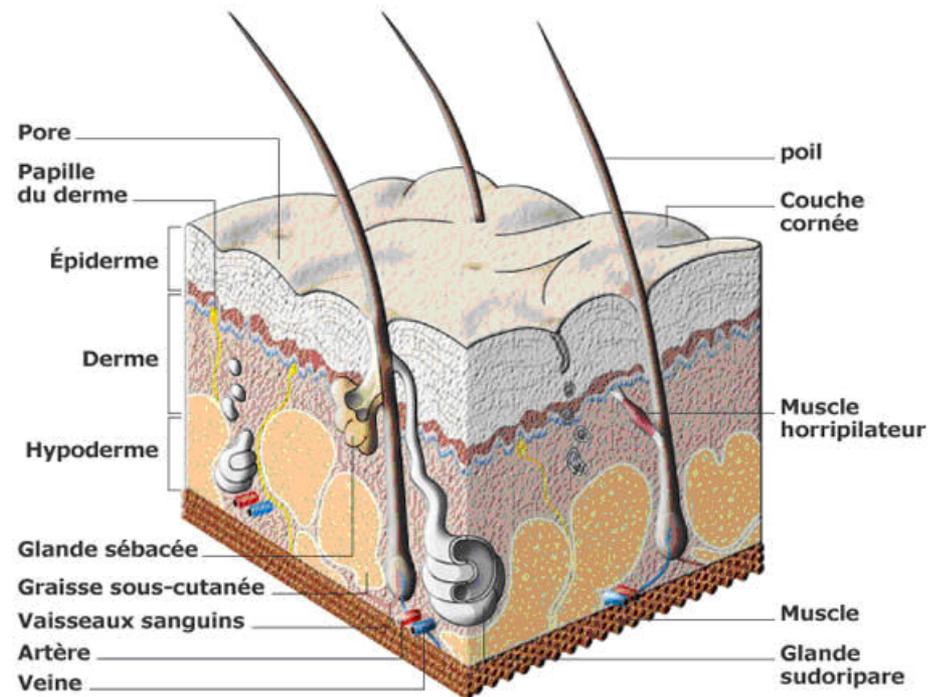
I – Thème du Stage

2/ La peau



Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique

- Organe le plus étendu ;
- Multiples fonctions ;
- 3 structures tissulaires ;
- Épiderme constitué à 90 % de Kératinocytes

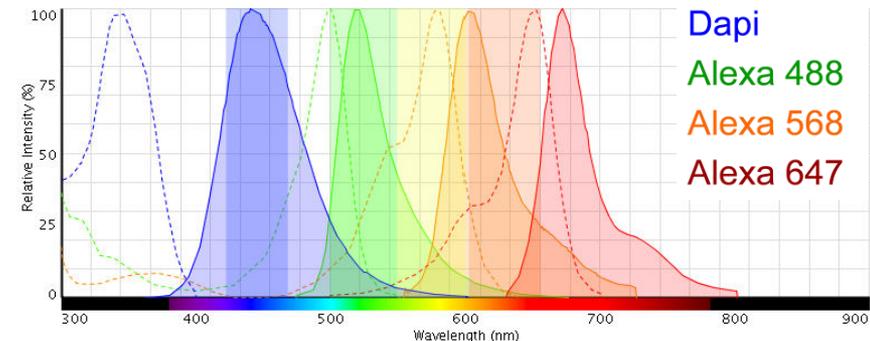


I – Thème du Stage

3/ Techniques d'Imagerie



- Microscopie par fluorescence ;
- Fluorescence : émission de lumière suite à l'absorption d'énergie lumineuse.
- Observation par marquage de structures ;
- Plusieurs zones spectrales observables simultanément.



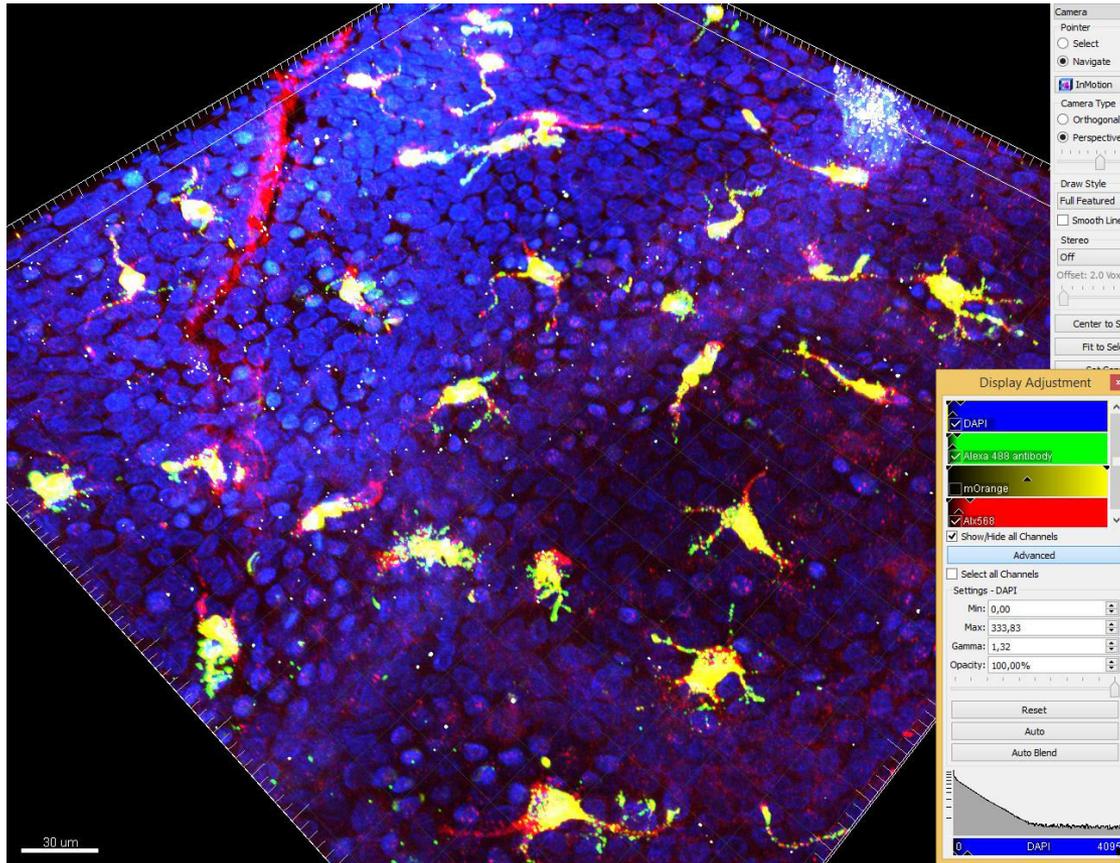
Spectres d'émission de différents marqueurs



I – Thème du Stage

3/ Techniques d'Imagerie

- Exemple d'image



I – Thème du Stage

4/ Objectifs



Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique

- Évaluation des différents outils à disposition ;
- Travail sur l'analyse de la qualité des images ;
- Décompte des cellules de Langerhans et des noyaux des Kératinocytes ;
- Segmentation des cellules et des noyaux.

Plan

- II - Contenu du stage

- Format des données

- Outils à disposition

- Analyse de la qualité des images

- Décompte

- Segmentation

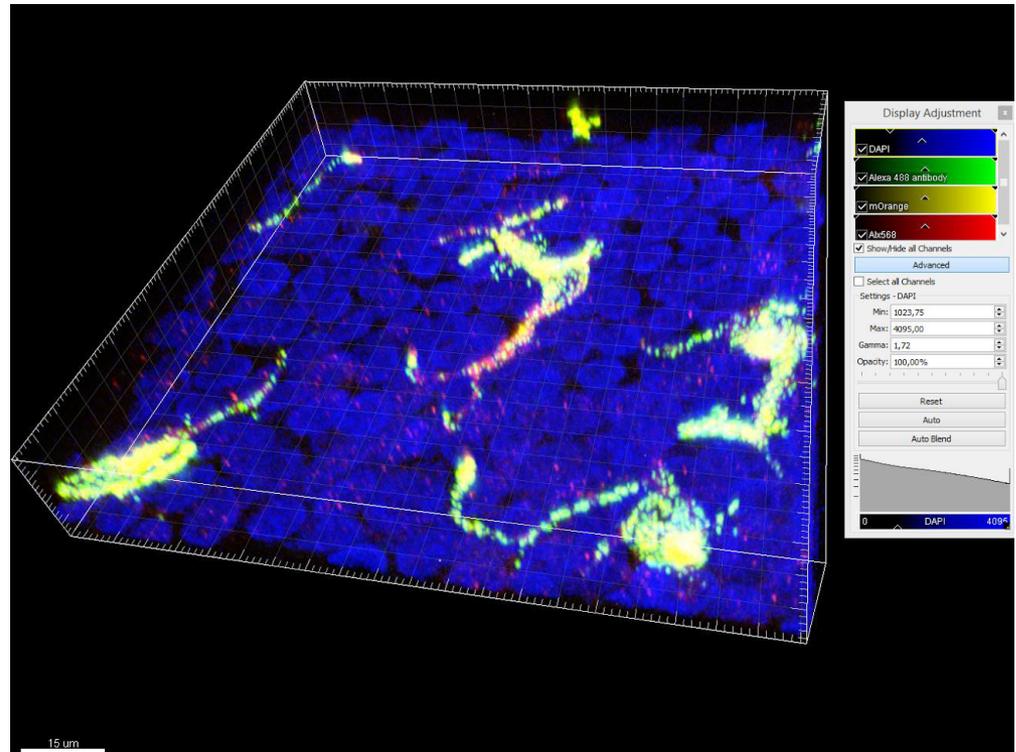




II – Contenu du stage

1/ Format des données

- Données et métadonnées stockées dans des *Bio-Formats* (.tif, .nd2, .oib) ;
- Niveaux de gris en 12 bits
- 5D : [x , y , z , c , t] ;
- Problèmes :
 - Marqueurs granuleux et discontinus
 - Dendrites
 - Maillages des noyaux





II – Contenu du stage

2/ Outils à disposition

ImageJ

- *Bio-Format*
- *3D Viewer*
- *3D Object Counter*

Matlab

- *3D Volume Viewer*
- *3D Segmentation*

Imaris

- *Filament Tracer*
- *Spot Detection*

Avizo Fire

II – Contenu du stage

3/ Étude de la qualité des Images



- 3.1 – Estimation du niveau de bruit
- 3.2 – Snr (Rapport Signal sur Bruit)
- 3.3 – Photoblanchiment
- 3.4 – Moyennage d'Images



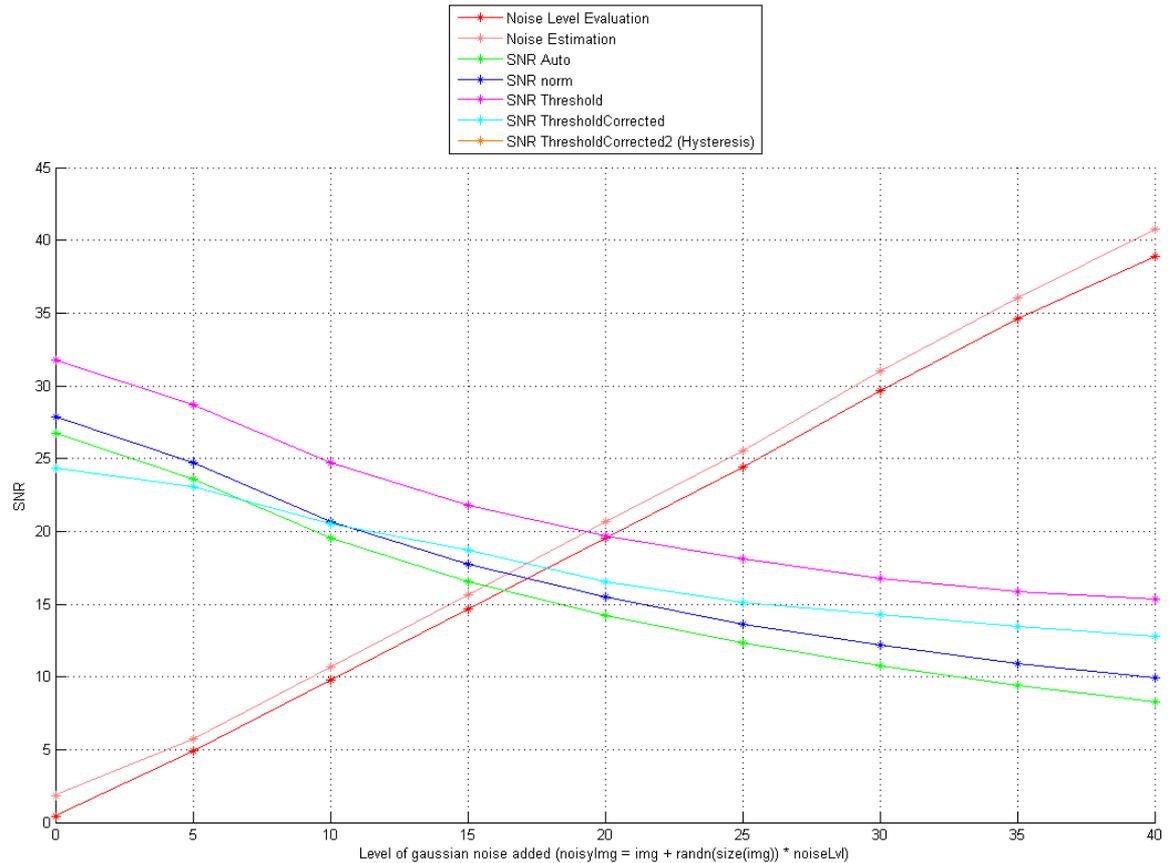
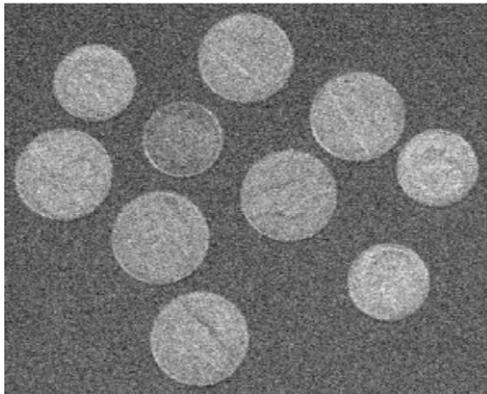
II – Contenu du stage

3/ Étude de la qualité des Images

coins.png



Image bruitée





II – Contenu du stage

3/ Étude de la qualité des Images

3.1 - Estimation du niveau de bruit

<p>Méthode 1</p>	<p>Adaptation de la somme des valeurs absolues du Laplacien.</p>	<p>« <i>Fast Noise Variance Estimation</i> », <i>Computer Vision and Image Understanding</i>, Vol. 64, No. 2, pp. 300-302, Sep. 1996</p>
<p>Méthode 2</p>	<p>Textures détaillées non considérées comme du bruit.</p>	<p><i>Noise Level Estimation Using Weak Textured Patches of a Single Noisy Image</i></p> <p>Auteurs : Xinhao Liu, Masayuki Tanaka and Masatoshi Okutomi</p>

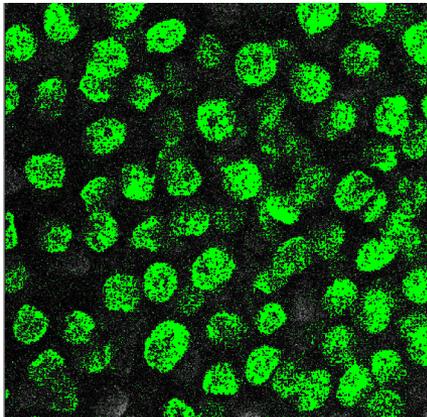


II – Contenu du stage

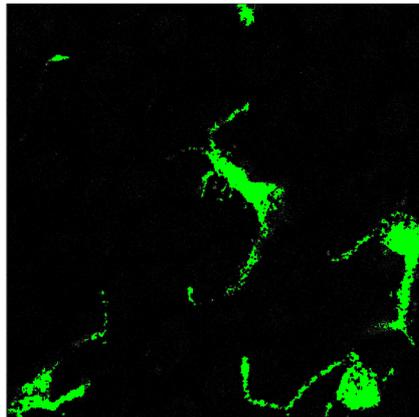
3/ Étude de la qualité des Images

3.2 – Snr (Rapport Signal sur Bruit)

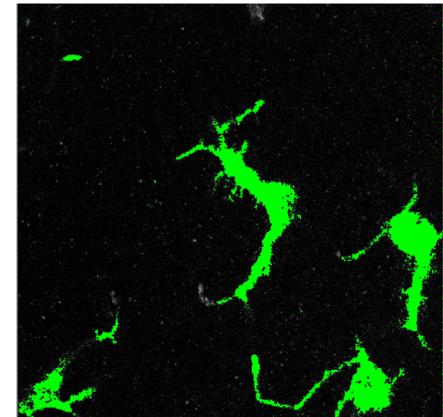
Snr	$20 \cdot \log(\text{moyenne}(\text{Signal}) / \text{écartType}(\text{bruit}))$
Snr v6	$\text{mask} = \text{seuillageAHysteresis}(\text{image}, \text{seuil1}, \text{seuil2})$ $\text{snr} = 20 \cdot \log(\text{moyenne}(\text{image}(\text{mask})) / \text{déviationStandard}(\text{image}(\sim \text{mask})))$



Canal 1, marqueur Dapi, $\lambda = 400-492 \text{ nm}$



Canal 2, Alexa 488, $\lambda = 500-550 \text{ nm}$



Canal 4, Alx 568, $\lambda = 608-655 \text{ nm}$



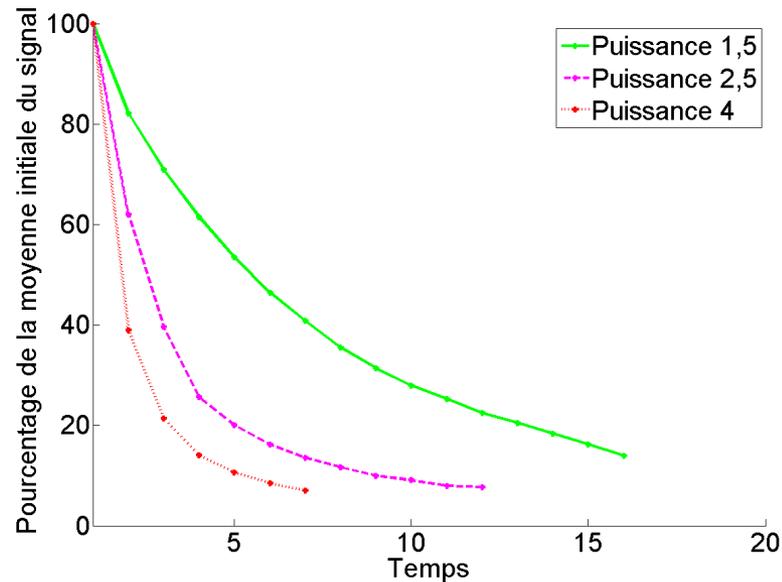
II – Contenu du stage

3/ Étude de la qualité des Images

3.3 – Photoblanchiment

Moyenne des intensités du volume défini par seuillage à Hysteresis (en pourcentage)

- Photoblanchiment : Dégradation de l'échantillon à cause du laser par exemple.



Canal 4, Alx 568, $\lambda = 608-655 \text{ nm}$

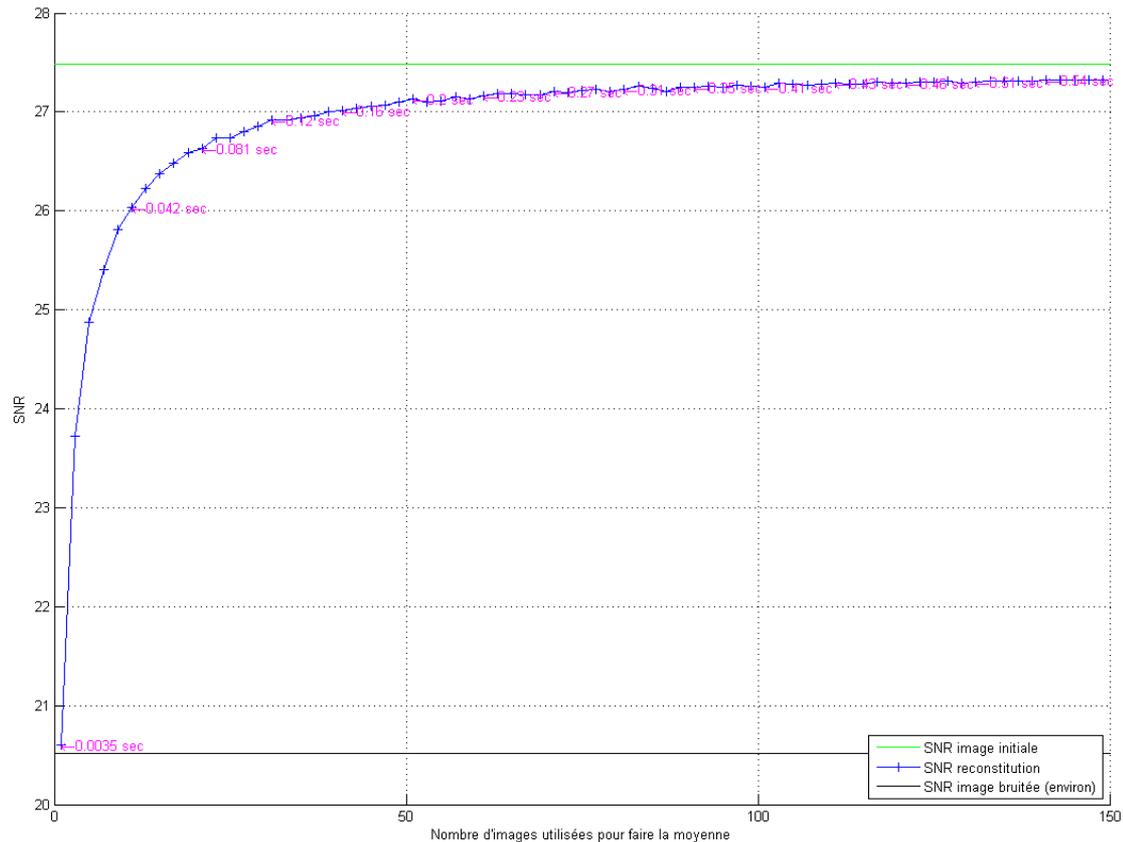


II – Contenu du stage

3/ Étude de la qualité des Images

3.4 – Moyennage d'images

- But : évaluer l'influence du moyennage d'images.
- Test sur l'image coins.png bruitée n fois.
- Observations :
 - Nette augmentation en utilisant jusque 11 images (de 20,5 à 26 avec pour but 27,5)
 - On tend bien vers le snr initial.





II – Contenu du stage

4/ Décompte cellules de Langerhans

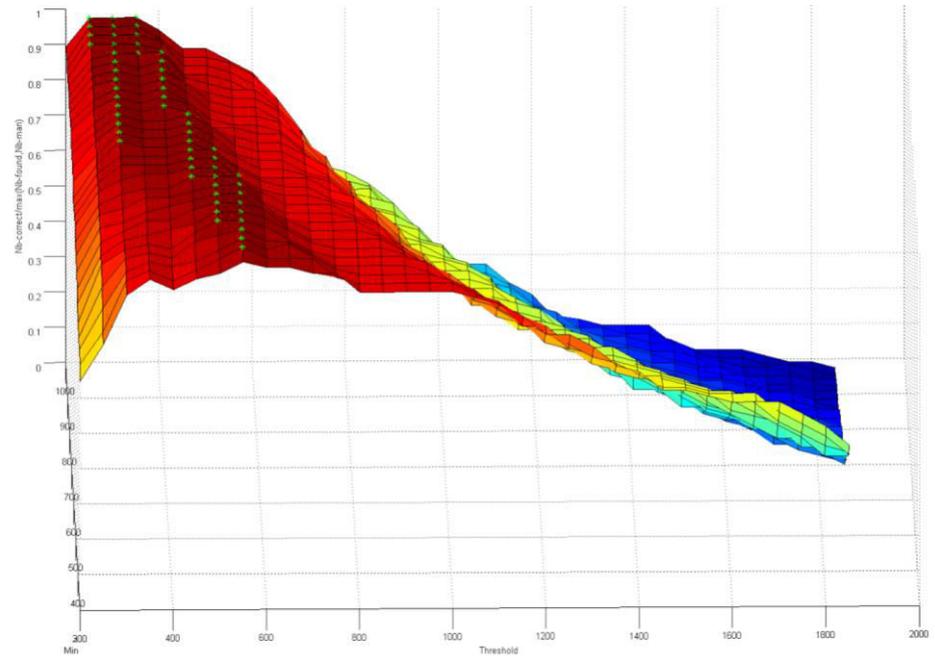
- Plugin *3D Object Counter* (ImageJ)

- Taille minimale ;
- Taille maximale ;
- Seuil ;

- Espace choisi : (TailleMin, Seuil)

- Rapport :

$$\frac{Nb_{\text{bienPlacés}}}{\max(Nb_{\text{manuel}}, Nb_{\text{plugin}})}$$

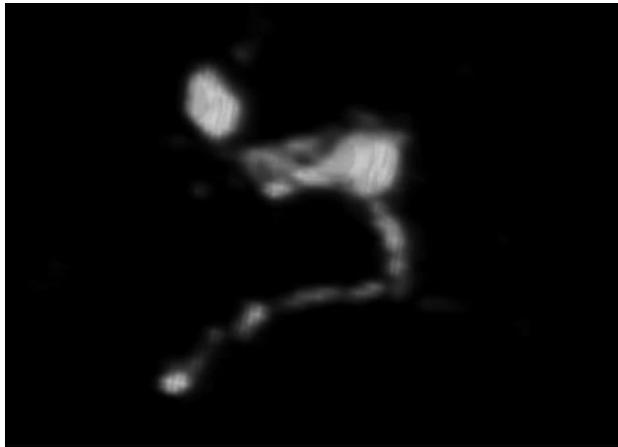




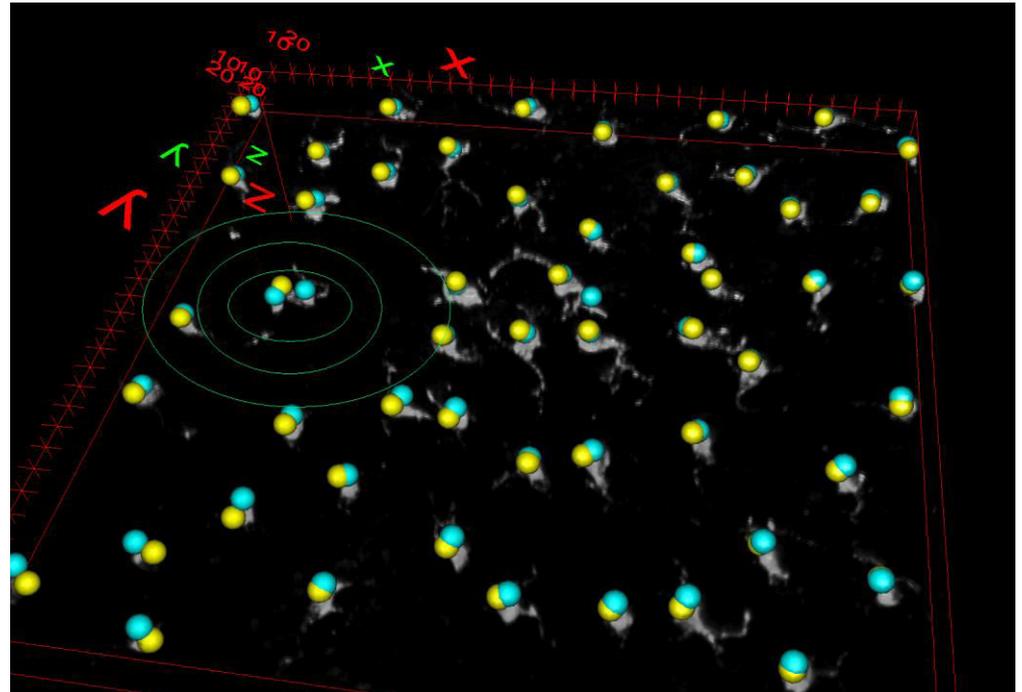
II – Contenu du stage

4/ Décompte cellules de Langerhans

- Cellules problématiques :



Mais erreur < 5 % :
-> Acceptable



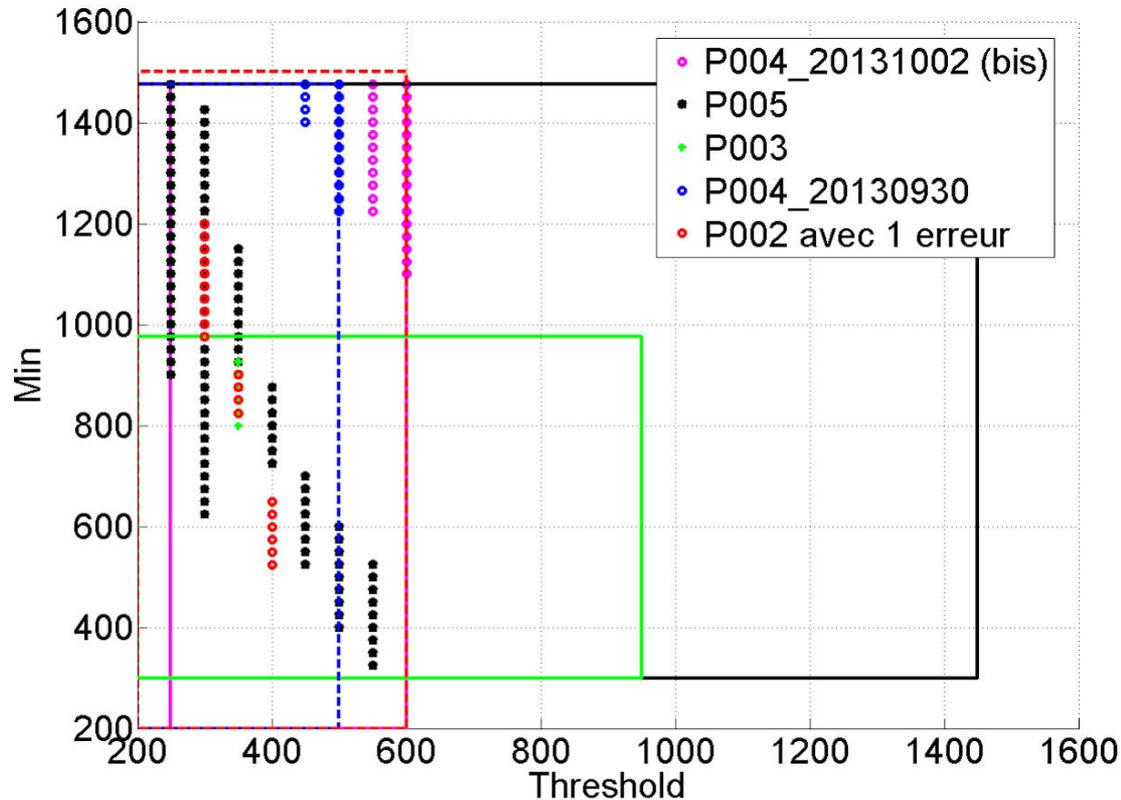
- Estimation : 50 cellules de Langerhans (1 par $50 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$)



II – Contenu du stage

4/ Décompte cellules de Langerhans

- Plages de paramètres non superposables.
- 5 sets de données différents.
- Même intensité moyenne.
- Même intensité maximale.



Plage de paramètres sur différents sets de données

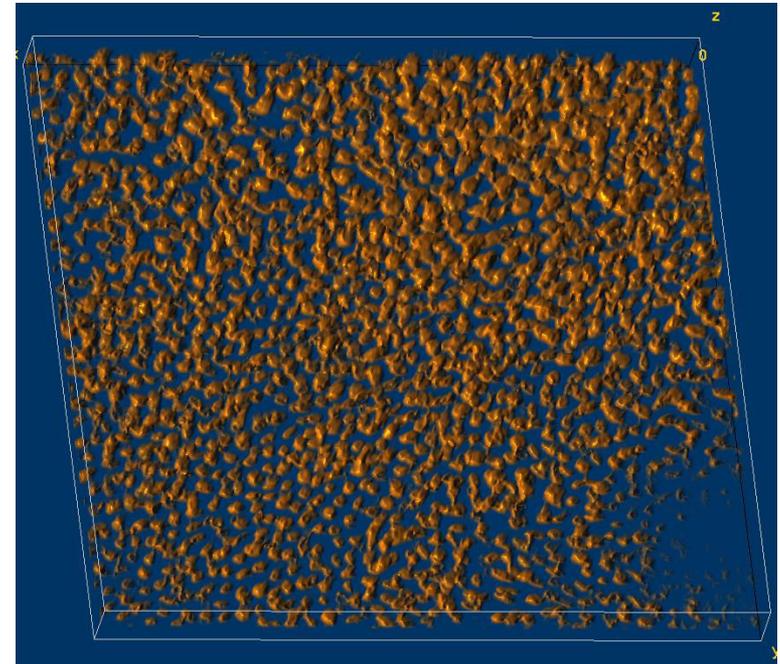
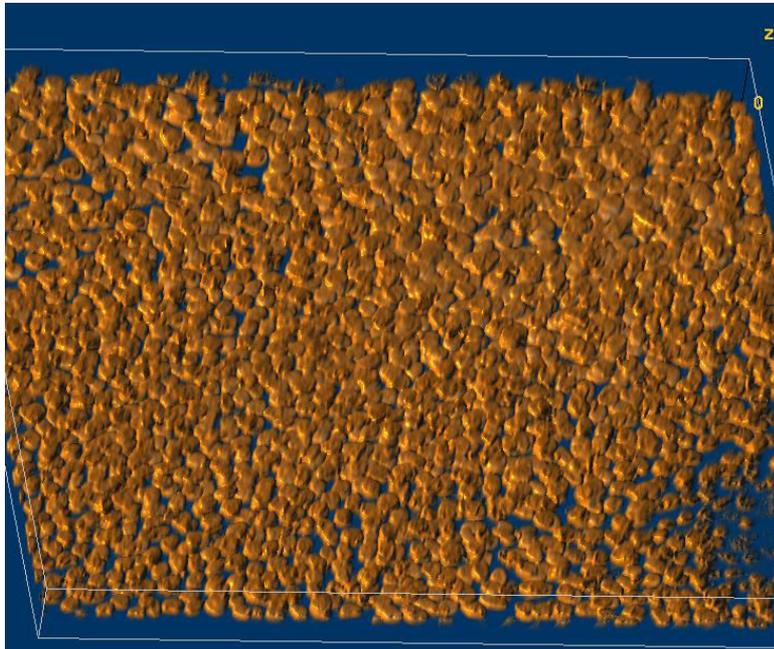
Solution automatique difficilement envisageable.

II – Contenu du stage

5/ Décompte des noyaux des Kératinocytes



- Noyaux des Kératinocytes ;



II – Contenu du stage

5/ Décompte des noyaux des Kératinocytes

- 3 méthodes d'estimation du nombres de noyaux :

Méthode 1	Positionnement manuel des noyaux	environ 1250 cellules
Méthode 2	Estimation par le volume moyen d'un noyau	environ 2030 cellules
Méthode 3	Estimation par nombre de noyaux dans un sous-volume	environ 1460 cellules

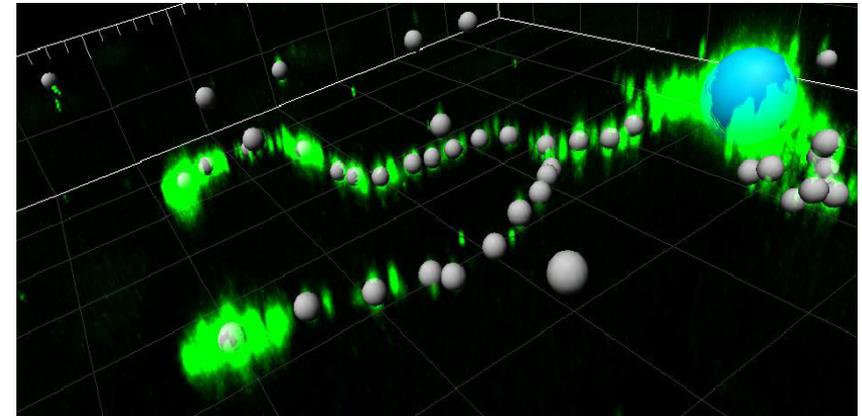
(Méthode 2 la plus fiable)

- Estimation : environ 1950-2050 noyaux : 1 par $1,3 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$

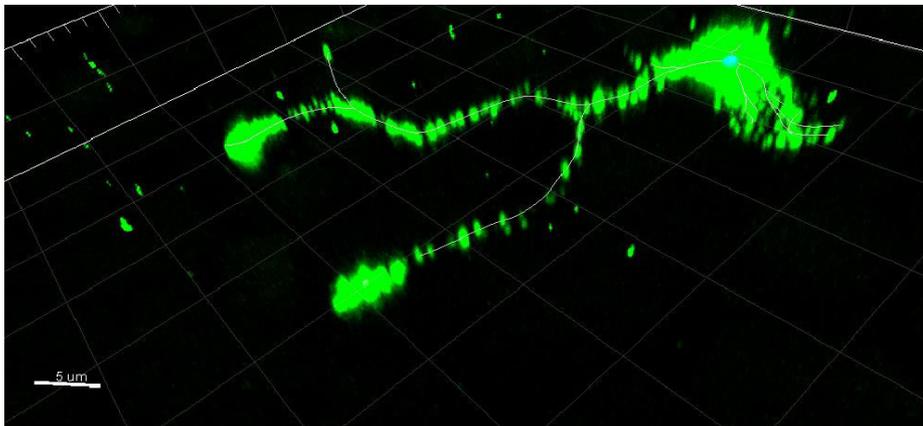
II – Contenu du stage

6/ Segmentation des cellules de Langerhans

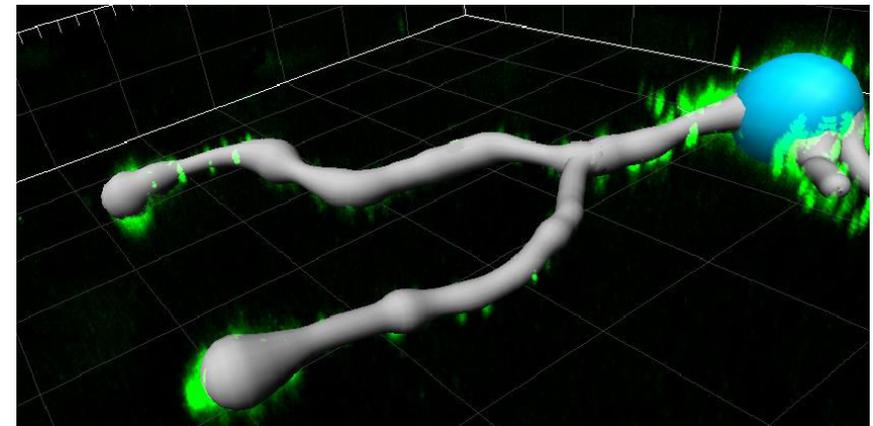
- Filament tracer :
 - Taille maximale d'une dendrite ;
 - Taille minimale d'une dendrite ;
 - Espace maximal entre deux dendrites.



- Gros grain :



- Gros grain enlevé :

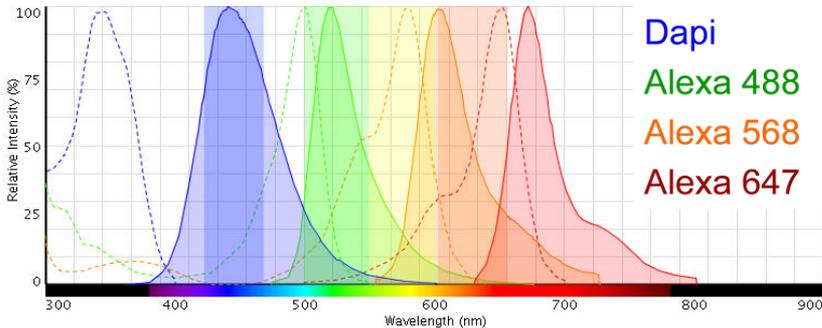
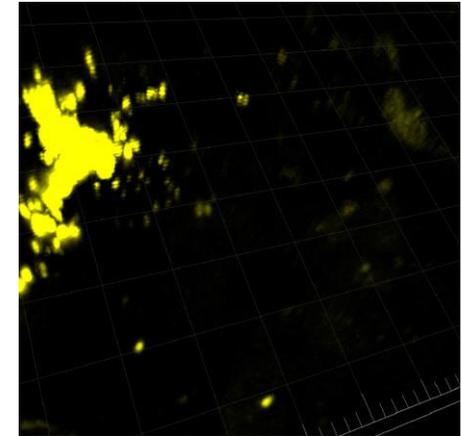
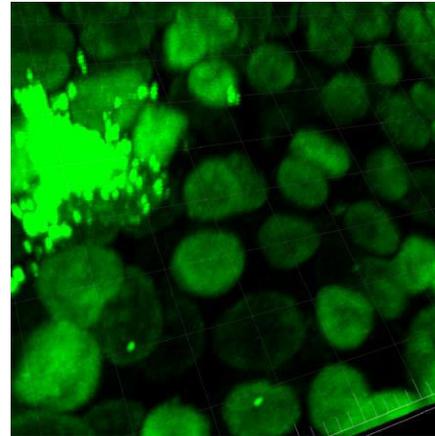




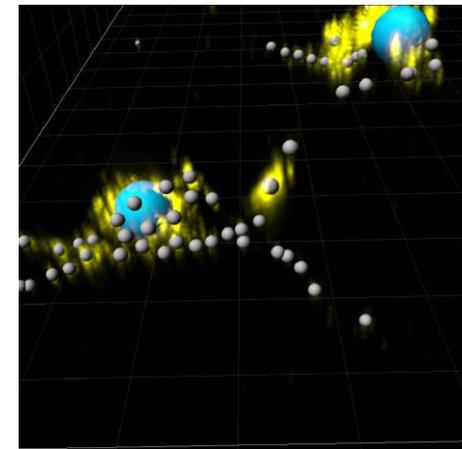
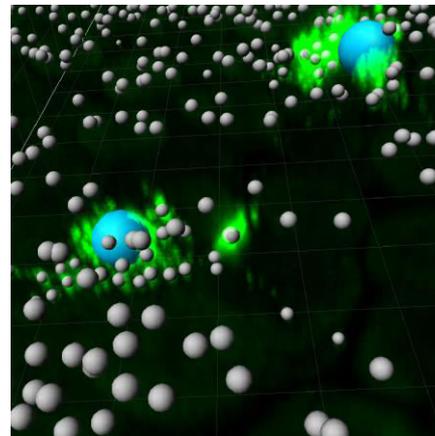
II – Contenu du stage

6/ Segmentation des cellules de Langerhans

- *Unmixing* des canaux :
 - Utiliser le canal principal du marqueur pour diminuer sa présence dans un canal où sa présence est non souhaitée.



Spectres d'émission de différents marqueurs





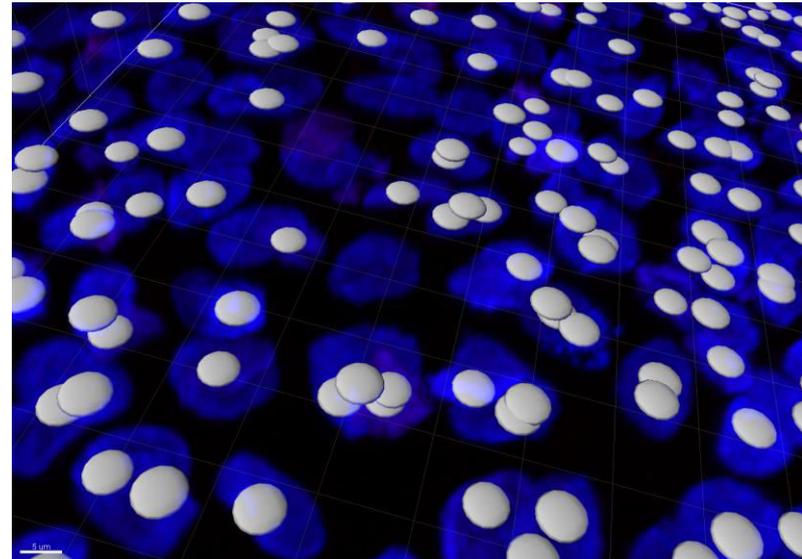
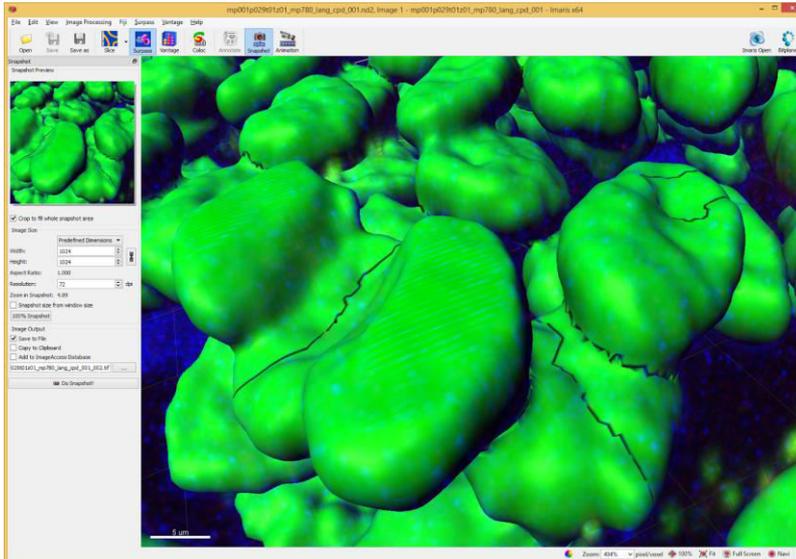
II – Contenu du stage

7/ Segmentation des noyaux des Kératinocytes

- 2 modules d'Imaris :

Volume

Spot detection

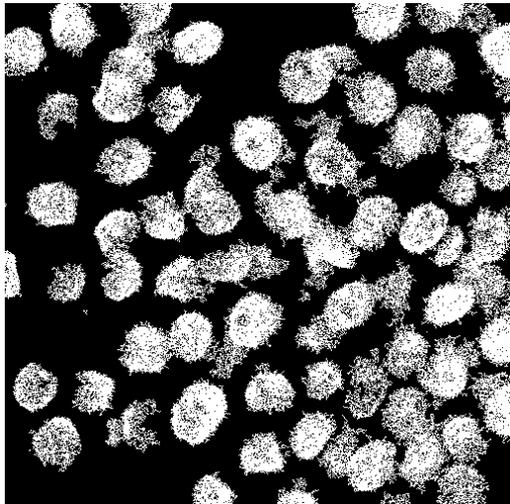


II – Contenu du stage

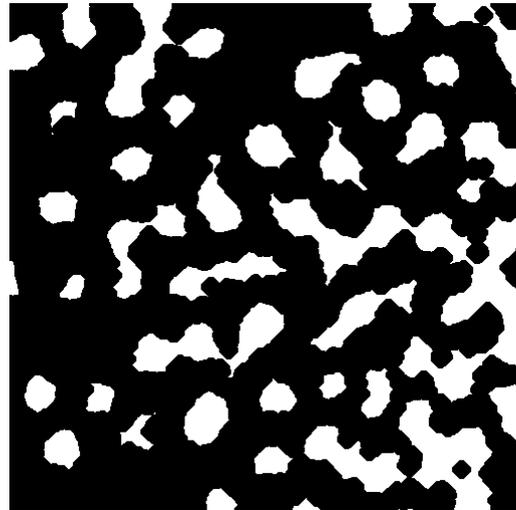
7/ Segmentation des noyaux des Kératinocytes

- Détection de centres grâce à une érosion modifiée:

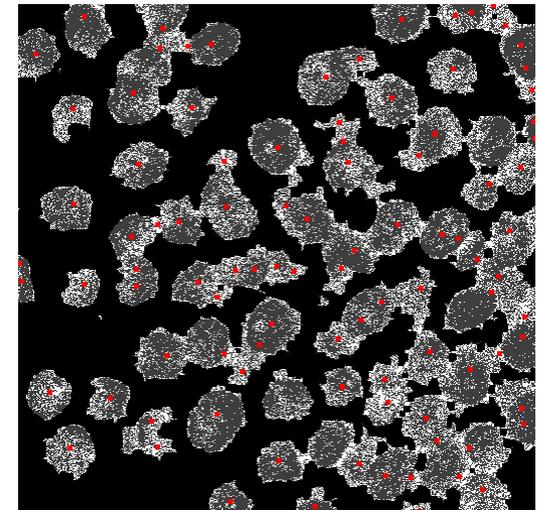
- Version 2D



Masque à Hysteresis



Ouverture logique



Résultat de l'érosion modifiée

III – Conclusion



- Analyse des outils
- Étude des images
- Segmentation des cellules de Langerhans
- Estimation du nombre de noyaux de Kératinocytes.

IV – Questions



Annexes

Comparaison du principe d'absorption monophotonique et multiphotonique

