HAL
open science

Segmentation multi-résolution basée sur la texture ; Application à la segmentation de très grandes images de microscopie cellulaire

Nicolas Signolle, Jérôme Delettre, Marinette Revenu, Paulette Herlin, Benoît Plancoulaine

To cite this version:

Nicolas Signolle, Jérôme Delettre, Marinette Revenu, Paulette Herlin, Benoît Plancoulaine. Segmentation multi-résolution basée sur la texture ; Application à la segmentation de très grandes images de microscopie cellulaire. MajecSTIC 2007, 2007, Caen, France. 10 p. hal-00808703

HAL Id: hal-00808703

https://hal.science/hal-00808703v1

Submitted on 6 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MajecSTIC 2007

Caen

Segmentation multi-résolution basée sur la texture ; Application à la segmentation de très grandes images de microscopie cellulaire.

Nicolas Signolle[1,2], Jérôme Delettre[1], Marinette Revenu[1], Paulette Herlin[2], Benoît Plancoulaine[2]

[1] GREYC ENSICAEN UMR 6072
[2] GRECAN EA 1772

nicolas.signolle@greyc.ensicaen.fr

Résumé:
Ce papier présente une stratégie de segmentation multi-échelle, mettant en œuvre un modèle d'arbre de Markov caché appliqué sur les valeurs des coefficients en ondelettes, pour la segmentation de différents types de stroma sur de très grands volumes de données images.

Mot-clés : segmentation multi-échelle, modèle d'arbre de Markov caché, ondelettes, stroma, grandes images

Abstract:
In this paper, we study a multiscale segmentation strategy using wavelet-domain hidden Markov Tree Model. We present the results of segmentation of various types of stroma on large scale images.

Keywords : multiscale segmentation, hidden Markov Tree Model, wavelets, stroma, large scale images

Introduction

Pour apprécier l'évolution des tumeurs cancéreuses, il est souvent nécessaire de rechercher et de quantifier des structures cellulaires et tissulaires sur des sections histologiques. Pour effectuer cette mesure de manière objective, il faut acquérir une image de la préparation entière car les structures à détecter peuvent être réparties de manière hétérogène sur l'ensemble de la lame. Il convient en outre d'adapter la résolution de prise de vue à la taille des structures. Les images produites pour l'identification de petites structures sont alors de très grands volumes (plusieurs giga octets) et il est impossible de les traiter globalement. Les travaux sur les images de grande taille sont encore peu nombreux [Ho 06,

Pan 04]. La méthode que nous avons retenue pour analyser ces grandes images consiste à effectuer une analyse à plusieurs échelles en adaptant la résolution de travail à chaque type de structure que nous voulons segmenter.
L'étude présentée ici vise à segmenter des compartiments tissulaires tumoraux en faisant d'une part la partition entre les cellules cancéreuses et le stroma fibro-nourricier des tumeurs et d'autre part en caractérisant différents compartiments stromaux. Les compartiments du stroma tumoral peuvent être distingués par leur aspect, et non par leur couleur. Nous faisons l'hypothèse que chaque stroma correspond à une texture particulière que nous allons caractériser.
La segmentation d'une image texturée consiste en l'identification de régions de texture homogène. De nombreux travaux ont été menés sur la segmentation d'images de texture. On distingue trois catégories de méthodes : les méthodes statistiques s'appuyant sur la distribution spatiale des niveaux de gris, les méthodes basées sur la construction d'un modèle, et les méthodes fondées sur les mécanismes de la vision humaine, faisant intervenir plusieurs niveaux de résolution [Dombre 03].
Le modèle d'arbre de Markov caché (*Hidden Markov Tree, HMT*) proposé par Crouse [Crouse 98] offre le moyen de combiner ces différentes approches. Il correspond à une modélisation statistique intra-échelle et inter-échelle des coefficients obtenus par une transformation en ondelettes (*TO*) [Mallat 00] et il exploite le pouvoir de décorrélation de cette transformée. L'objectif est de capturer la dépendance inter-échelle des coefficients et le caractère non gaussien de la distribution des coefficients à chaque échelle.
Nous avons appliqué ce modèle à la segmentation de différents compartiments de stroma présents sur une image de lame histologique entière de cancer ovarien, acquise à forte résolution ($0,5\ \mu m$).

Dans la suite de cet article, nous décrirons précisément les structures que nous souhaitons segmenter ainsi que les outils théoriques employés. Nous présenterons ensuite nos résultats avant de conclure sur les perspectives qu'offre ce travail.

1 Matériel

Lorsqu'un patient est opéré d'une tumeur cancéreuse, la pièce d'exérèse est découpée en fines lamelles de $5\ \mu m$ d'épaisseur qui sont déposées sur des lames de verre, puis colorées par immuno-histochimie ou par histochimie afin de mettre en évidence certains types cellulaires, ou protéines (nucléaires, cytoplasmiques ou membranaires) dont la présence peut ensuite être quantifiée pour apprécier le potentiel d'évolution de la tumeur et choisir la thérapie adaptée. Dans le cas du carcinome ovarien [Figure 1], les chercheurs souhaitent préciser le rôle du stroma intra-tumoral dans l'évolution des tumeurs et la réaction aux traitements.

Le tissu cancéreux ovarien comporte deux composantes : les cellules épithéliales carcinomateuses [Figure 2] et le stroma. Le stroma est un tissu conjonctivo-vasculaire non tumoral qui est présent dans tous les types de cancers invasifs d'origine épithéliale. Il est induit par les cellules cancéreuses et leur sert de tissu nourricier et de soutien. [Audouin 07].
On observe plusieurs types de stroma [Figure 3] au sein des tumeurs correspondant à différents degrés de maturation : le stroma lâche, le stroma cellulaire et le stroma fibreux. On trouve également du stroma inflammatoire, pouvant être présent au sein des autres compartiments stromaux.

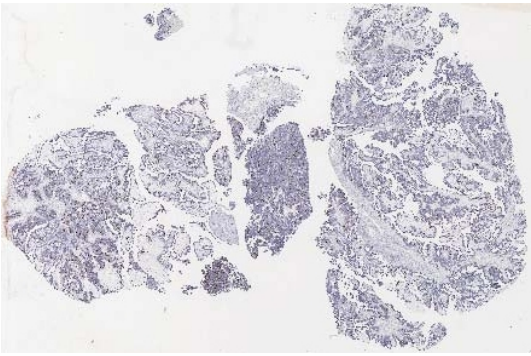

FIG. 1 – Image d'une lame histologique de carcinome ovarien acquise avec un Scanscope d'Aperio. La taille d'origine est de 62000 x 41404 pixels.

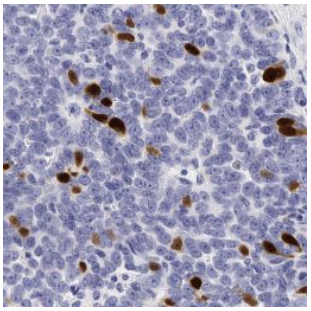

FIG. 2 – L'épithélium. Les noyaux des cellules en prolifération sont marqués en brun, les-noyaux des autres cellules sont bleus.

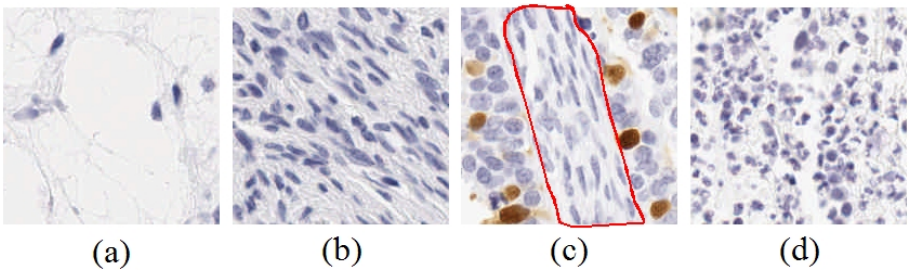

FIG. 3 – Les différents types de stroma au x20 (a) stroma lâche (b) stroma cellulaire (c) stroma fibreux (zone entourée) (d) stroma inflammatoire.

– Le stroma lâche est un stroma embryonnaire. Il est composé de matrice extracellulaire et de cellules étoilées. La densité de répartition de ces cellules est faible. Les noyaux sont de petite taille. On peut y rencontrer de grandes lacunes vasculaires.
– Le stroma cellulaire est un tissu conjonctif jeune. Il est constitué de cellules myofibroblastiques en trousseaux avec une forte densité de répartition. Les noyaux sont allongés et oblongs.
– Le stroma fibreux est un stroma mature avec une densité de répartition des cellules un peu plus faible que le stroma cellulaire et un grand nombre de fibres extracellulaires faites de collagène. Les noyaux sont fins et très allongés. Leur densité optique est très importante, elle correspond à une phase de condensation de la chromatine.
– Le stroma inflammatoire est caractérisé par de petits noyaux de forme circulaire de forte densité optique (lymphocytes). Il peut également renfermer des cellules polynucléaires (noyau en trèfle) et des globules rouges extravasés.

Les images que nous avons étudiées sont des coupes de carcinomes ovariens marquées à la cycline A, un marqueur de la prolifération cellulaire, et contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer. Les noyaux des cellules tumorales et stromales sont colorés en bleu, les noyaux en prolifération sont marqués en brun.
Les images ont été acquises à l'aide du scanner ScanScope CS d'Aperio Technologies avec un grossissement de 20, correspondant à une résolution de $0,5\ \mu m$. Les images ont un volume en mémoire compris entre 3 et 10 Go selon la surface du tissu scanné.

2 Méthodes

2.1 Une stratégie multi-résolution

Des travaux antérieurs fondés sur des stratégies d'analyse à basse résolution ($6.3\ \mu m$) ont déjà permis de segmenter et de quantifier des marqueurs (quantification des noyaux marqués, de l'épithélium, des vaisseaux sanguins, du stroma [Tran 03, Elie 03] [Figure 4]). Cependant, l'analyse précise des compartiments stromaux, qui implique une identification cellulaire, est impossible à cette échelle car la représentation d'une cellule est formée de seulement quelques pixels.

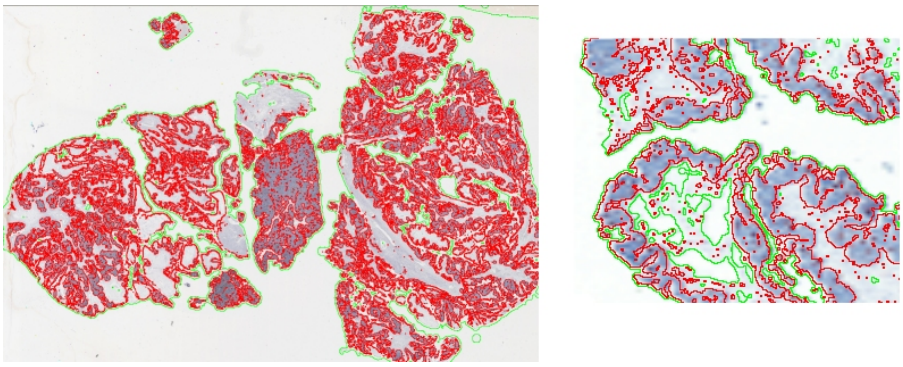

FIG. 4 – Superposition sur l'image couleur à faible résolution du contour des zones segmentées : le tissu (en vert) et l'épithélium (en rouge). Á droite un détail de l'image de gauche.

Nous proposons une méthode d'analyse de l'image à haute résolution. La première idée qui vient à l'esprit consiste à traiter l'image par blocs. La difficulté réside dans le fait que cela implique de très fortes contraintes aux bords des images élémentaires, notamment pour gé-

rer les structures qui peuvent s'étendre sur plusieurs images. En outre, la segmentation de structures de grande taille doit impliquer des caractéristiques locales et globales qu'il est difficile de prendre en compte. L'approche multi-résolution adoptée va consister par contre à sélectionner, à différentes résolutions, des zones d'intérêt dans lesquelles il y a des objets à segmenter ce qui permet d'adapter la décomposition de l'image à son contenu. Une structure de « grande taille » va être segmentée à faible résolution (la taille de l'image étant alors suffisamment petite pour être chargée en mémoire, il n'y a pas à gérer d'éventuels effets de bord). Cette segmentation servira de masque pour segmenter une structure de taille plus petite dans une image plus résolue. Le procédé peut être répété jusqu'à la localisation de structures très petites dans l'image à pleine résolution. La « pré-localisation » dans un masque nous permet de traiter des parties de l'image en s'affranchissant du problème de chevauchement des grandes structures sur plusieurs imagettes élémentaires.
La décimation est obtenue par transformation en ondelettes (selon l'algorithme de Mallat, [Mallat 00]). Une première séparation entre le fond de l'image et le tissu est réalisée à très faible résolution ($32\ \mu m$). L'histogramme de l'image est considéré comme un mélange de trois gaussiennes (un mode bien distinct pour le fond, et deux modes proches pour le stroma et l'épithélium). Les paramètres de ces trois gaussiennes ayant été estimés par analyse de l'histogramme, on peut calculer la probabilité pour chacun des pixels d'appartenir à l'une des classes (fond ou tissu), et segmenter l'image par maximum de vraisemblance. Le résultat est amélioré par quelques opérations de morphologie mathématique (bouchage de trous et ouverture géodésique) [Figure 5].

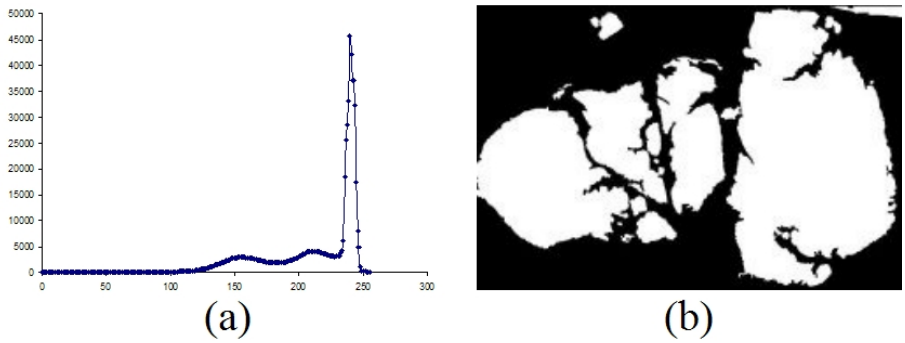

FIG. 5 – (a) histogramme de l'image de la [Figure 1] (b) résultat de la partition tissu-fond

A l'intérieur du tissu, nous appliquons le modèle de HMT utilisant les statistiques marginales des coefficients en ondelettes.

2.2 Le modèle d'arbre de Markov caché HMT

L'idée d'utiliser les coefficients en ondelettes pour réaliser la segmentation de texture n'est pas récente. Dès 1995, Unser [Unser 95] extrait des paramètres à différentes échelles d'ondelettes pour classer des textures. Bouman [Bouman 94] utilise un modèle multi-échelle mais considère que les valeurs des pixels sont indépendantes, ce qui n'est pas toujours vrai. Pour modéliser les dépendances intra- et inter-échelles simultanément, Crouse [Crouse 98] propose d'utiliser un modèle de mélange de gaussiennes indépendantes appliqué aux coefficients d'ondelettes dans chaque sous-bande, et un arbre de Markov caché (HMT).
A chaque échelle, la valeur des coefficients d'ondelettes dépend de la régularité du signal. Une singularité va se traduire par un grand coefficient d'ondelettes qui pourra se propager à travers les échelles, alors qu'une zone comportant des valeurs variant peu donnera lieu à une série de petits coefficients. Ces propriétés de la transformée en ondelettes font qu'il

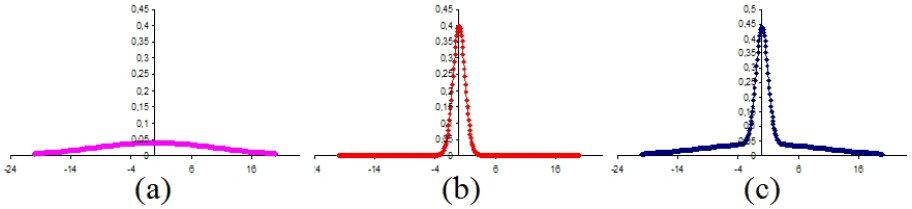

FIG. 6 – Le modèle de mélange de gaussiennes à moyenne nulle à 2 états. (a) distribution des grands coefficients (b) distribution des petits coefficients (c) le modèle de distribution des coefficients en ondelettes dans une sous-bande.

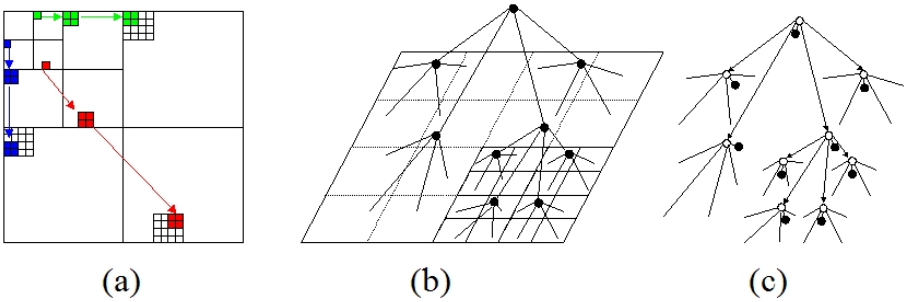

FIG. 7 – a) Les dépendances père-fils des sous-bandes de la TO. Chaque flèche part d'un coefficient d'ondelettes père et pointe vers ses 4 coefficients fils à la résolution supérieure. (b) La structure en quadtree du modèle, détaillée pour une sous-bande. (c) le modèle HMT, détaillé pour une sous-bande. Chaque coefficient en ondelettes (nœud noir) est modélisé par un mélange de gaussiennes contrôlé par un état caché (nœud blanc).

y a un petit nombre de grands coefficients portant l'énergie du signal, et beaucoup de petits coefficients. On peut considérer que chaque coefficient est dans l'un des deux états G (grand) ou P (petit). Si on associe à chaque état une densité de probabilité, c'est à dire une densité à forte variance et à moyenne nulle pour l'état G et une densité à faible variance et à moyenne nulle pour l'état P, on obtient un modèle de mélange à deux états pour chaque coefficient d'ondelettes [Figure 6].

Nous avons vu qu'il existait des dépendances inter-échelles entre les coefficients en ondelettes. Pour les capturer, le modèle utilise une chaîne de Markov à une dépendance entre les niveaux de résolution [Figure 7].

Ce modèle est utilisé par Choi [Choi 01] pour réaliser la segmentation d'images texturées. La méthode comporte trois phases : une phase d'apprentissage, une phase de segmentation à chaque échelle et une phase de fusion inter-échelles. Lors de la phase d'apprentissage, les paramètres du modèle $\mathcal{M}$ sont appris pour chaque texture grâce à un algorithme EM (*Expectation Maximisation*) adapté aux HMT et au modèle de mélange de gaussiennes [Crouse 98] : pour chaque état (G ou P), on apprend, pour chaque niveau et pour chaque sous-bande, les paramètres de la gaussienne le représentant (moyenne, variance et probabilité d'apparition), ainsi que les paramètres de transition d'un état à un autre entre deux résolutions (soit 4 paramètres de la forme

$$\begin{bmatrix} \varepsilon_{f=P}^{p=P} & \varepsilon_{f=G}^{p=P} \\ \varepsilon_{f=P}^{p=G} & \varepsilon_{f=G}^{p=G} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{f=P}^{p=P} & 1-\varepsilon_{f=P}^{p=P} \\ 1-\varepsilon_{f=G}^{p=G} & \varepsilon_{f=G}^{p=G} \end{bmatrix}$$

où $\varepsilon_{f=b}^{p=a}$ représente la probabilité que le père soit à l'état *a* quand le fils est à l'état *b*).
Lors de la phase de segmentation, la ressemblance entre les données de la transformée en ondelettes de l'image observée et le modèle HMT des images d'apprentissage est évaluée par le calcul d'une fonction de vraisemblance.

$$f(\mathcal{T}_i|\mathcal{M}) = \prod_{orientations} \sum_{m=P,G} f(\mathcal{T}_i|S_i = m, \mathcal{M}_o) * p(S_i = m\,|\mathcal{M}_o)$$

Où $\mathcal{T}_i$ est un sous-arbre de racine w_i dans l'une des sous-bandes, $\mathcal{M}_o$ représente les paramètres du modèle pour une orientation particulière et S_i est l'état caché de w_i.
On affecte ensuite, par maximum de vraisemblance, chaque pixel à la texture la plus semblable. On obtient une segmentation dite « brute », à chaque niveau.

Pour améliorer cette première segmentation, on réalise ensuite une fusion entre les segmentations des différentes résolutions. Cette fusion est réalisée en maximisant la probabilité d'appartenance d'un pixel à une classe, en tenant compte de sa valeur dans la segmentation brute et aussi d'un vecteur de contexte. Ce vecteur de contexte peut être la valeur du père et des voisins du père [Choi 01], des voisins du fils, ou bien une combinaison de plusieurs vecteurs de contexte [Fan 01] [Figure 8].

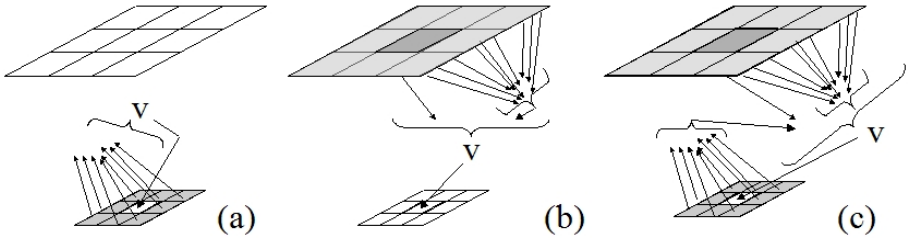

FIG. 8 – Les différents vecteurs de contexte V utilisés : a) les voisins du fils (b) les voisins du père et le père (c) les voisins du fils et du père et le père.

3 Résultats et discussion

Pour tester l'algorithme de segmentation, nous avons utilisé des images synthétiques de taille 1024 x 1024, constituées d'une mosaïque de textures de Brodatz [Figure 9].

Nous avons entraîné le modèle de HMT pour chacune des textures sur quatre images de taille 512 x 512. La fusion des segmentations brutes a été réalisée avec les trois voisinages présentés en [Figure 8]. Au vu de l'image de résultat [Figure 9], nous pouvons dire que, à l'échelle 1 (décimation par 2 de l'image originale), seules trois textures sont correctement classées. A partir de l'échelle 2 (décimation par 4 de l'image originale), on obtient une bonne segmentation de toutes les textures et une bonne localisation des frontières. Ceci peut s'expliquer par le fait que, à l'échelle 1, les informations spatiales sont encore trop présentes. Il faut obtenir un certain degré d'abstraction de la texture pour réaliser une bonne segmentation. Il existe ainsi une échelle présentant un bon résultat qui se situe aux alentours de l'échelle 2 (1/4) et 3 (1/8).

Nous avons ensuite testé l'algorithme sur des mosaïques de stroma [Figure 10]. Comme précédemment, le modèle a été appris sur 4 images de chaque texture de taille 512 x 512. Nous avons utilisé la composante bleue car elle donne les meilleurs résultats de segmentation. Comme pour les images synthétiques, on remarque qu'il faut atteindre une certaine échelle (ici 1/8) pour obtenir une séparation correcte des compartiments stromaux.

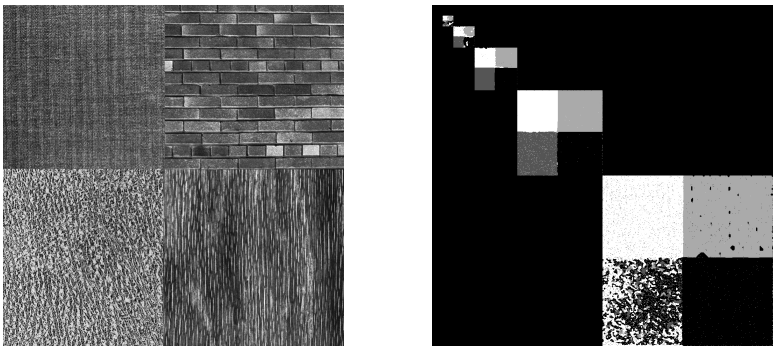

FIG. 9 – Mosaïque de 4 textures de Brodatz (gauche) et le résultat de leur segmentation à plusieurs échelles (droite).

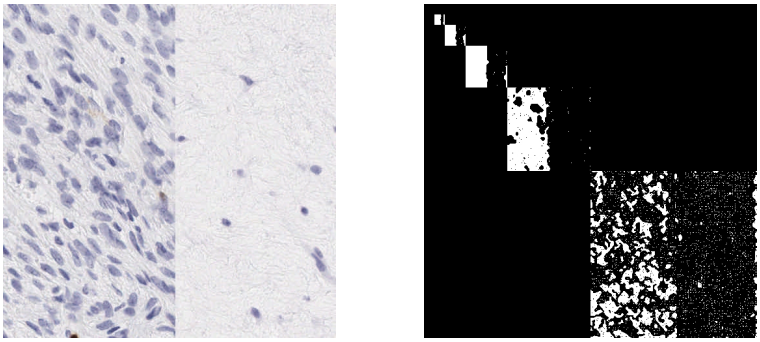

FIG. 10 – Image mosaïque de stroma cellulaire et de stroma lâche (gauche) et le résultat de la segmentation de l'image à plusieurs échelles (droite).

Nous avons également testé le modèle sur d'autres textures présentes sur l'image originale : l'épithélium et le fond [Figure 11].

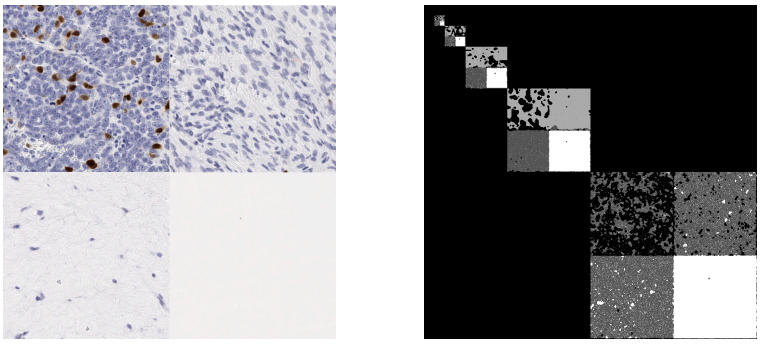

FIG. 11 – Image mosaïque de stroma cellulaire, de stroma lâche, d'épithélium et de fond (gauche) et le résultat de la segmentation de l'image à plusieurs échelles (droite).

Les conditions d'apprentissage sont identiques à celles de l'exemple précédent. On peut ici voir que le fond et le stroma lâche sont bien segmentés dès l'échelle 2. En revanche, l'épithélium n'est pas bien segmenté et il vient perturber la segmentation du stroma cellulaire. Ceci est un problème car cela veut dire que l'épithélium ne peut pas être segmenté avec la même méthode que le stroma, alors que ces structures sont voisines dans le tissu. Il faut donc avoir identifié (et exclu de l'analyse) le compartiment épithélial avant de segmenter le stroma avec cette méthode. Choi [Choi 01] propose d'intégrer au modèle une segmentation

au niveau pixel. Cette segmentation pourrait reprendre les résultats obtenus pour l'épithélium sur des données à basse résolution par l'équipe du GRECAN [Elie 03, Tran 03].

Pour vérifier la segmentation de chaque pixel, il faudrait calculer un indice de confiance représentant la qualité de la décision. Il nous permettrait de valider de manière certaine les segmentations réalisées.

Les temps d'exécution sont différents pour chaque étape. Les programmes ont été lancés sur un processeur d'un quadriprocesseur XEON 3GHz.

- La séparation du tissu et du fond est instantanée.
- L'apprentissage des paramètres $\mathcal{M}$ du modèle a été réalisé sur des images 512x512. Le temps de calcul dépend de la convergence de l'algorithme EM et varie de quelques secondes à quelques minutes par image.
- Les étapes de segmentation-fusion sont un peu plus longues : de l'ordre de 1 à 10 minutes pour une image 2048x2048.

Conclusion et perspectives

Dans cet article, nous avons vu que l'utilisation d'images à forte résolution (et donc de grande définition) est nécessaire pour pouvoir distinguer des structures à l'échelle cellulaire. Nous avons présenté une stratégie de segmentation multi-échelle utilisant un modèle d'arbre de Markov caché sur les valeurs de coefficients en ondelettes pour segmenter une très grande image. Nous avons vu que les résultats de segmentation des compartiments du stroma tumoral étaient bons et que les frontières entre régions étaient bien localisées à partir d'une certaine échelle. En revanche, certains compartiments (l'épithélium) doivent être écartés avant la segmentation des stromas.

Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec la composante bleue. Il faudrait maintenant tester d'autres espaces couleur. Scheunders [Scheunders 03] a notamment proposé une méthode pour construire une représentation en ondelettes combinant les plans couleur en calculant, à partir des trois valeurs, un coefficient traduisant l'importance relative de celles-ci.

Une autre manière d'améliorer la segmentation serait d'étudier l'influence des bases d'ondelettes utilisées pour la TO : certaines bases bi-orthogonales sont isotropes. Ceci peut se révéler intéressant lors de l'étude de structures circulaires comme les noyaux.

Enfin, nous pourrions envisager la combinaison de plusieurs méthodes de segmentation (utilisation de patchs, clustering ...) puis la fusion des résultats.

Remerciements

Ce travail est financé par une bourse BDI cofinancée par le CNRS et la région Basse Normandie.

Références

[Audouin 07] Audouin Berault J., site web accessible en Juin 2007 *https ://www.medecine.univ-paris5.fr/IMG/pdf/Cours_No8_Stroma_invasion_locale-3.pdf* faculté Broussais Hôtel Dieu université Paris VI.

[Bouman 94] Bouman C., Shapiro M., *A multiscale random field model for Bayesian image segmentation*, IEEE Transactions on Image Processing, vol. 3, n° 2, pp. 162–177, 1994.

[Choi 01] Choi H., Baraniuk R., *Multiscale image segmentation using wavelet-domain hidden Markov models*, IEEE Transactions on Image Processing, vol. 10, n° 9, pp. 1309-1321, 2001.

[Crouse 98] Crouse M., Nowak R., Baraniuk R., *Wavelet-based statistical signal processing using hidden Markov models*, IEEE Trans. Signal Processing, vol. 46, pp. 886–902, 1998.

[Dombre 03] Dombre J.*Systèmes de représentation multi-échelles pour l'indexation et la restauration d'archives médiévales couleur* Thése soutenue en Décembre 2003.

[Elie 03] Elie N., Plancoulaine B., Signolle JP., Herlin P. *A simple way of quantifying immunostained cell nuclei on the whole histologic section*, Cytometry, Vol 56A, Iss 1, 37-45, 2003.

[Fan 01] Fan G. Xia XG., *A joint multicontext and multiscale approach to Bayesian segmentation*, IEEE Trans. on Geoscience and Remote Sensing, 39(12) : 2680–2688, 2001.

[Ho 06] Ho J., Parwani AV., Jukic DM., et al., *Use of whole slide imaging in surgical pathology quality assurance : design and pilot validation studies*, Hum Pathol. 37(3) :322-31, 2006.

[Mallat 00] Mallat S., *Une exploration des signaux en ondelettes*, Publications Ecole Polytechnique, ISBN : 2-7302-0733-3, 654 pages, 2000.

[Pan 04] Pan T., Mosaliganti K., Machiraju R., Cowden D, Saltz J., *Large Scale Image Analysis and Nuclear Segmentation for Digital Microscopy Images*, APIII, Frontiers in Oncology and Pathology Informatics, Pittsburgh, 2004.

[Scheunders 03] Scheunders P., *An orthogonal wavelet representation of multivalued images*, IEEE Transactions Image Processing, vol. 12, n° 6, pp. 718 à 725, 2003.

[Tran 03] Tran TKN, Elie N., Plancoulaine B., Herlin P., Coster M., *An original approach for quantification of blood vessels on the whole tumour section*, Ana Cell Path., 25(2)63-75. 2003.

[Unser 95] M. Unser, *Texture Classification and Segmentation Using Wavelet Frames*, IEEE Transactions on Image Processing, Vol. 4, n° 11, pp 1549-1560, 1995.