

Analyse et Modélisation à l'Intérieur de Cellules Vivantes dans des Images 4D

Analysis and Modeling Inside Living Cells in 4D Images

Eric BITTAR¹, Aassif BENASSAROU¹, Laurent LUCAS¹,
Emmanuel ELIAS², Pavel TCHELIDZE², Dominique PLOTON², Marie-Françoise O'DONOHUE²

¹: Laboratoire LERI, EA2618

²: Unité MéDIAN, UMR CNRS 6142

Université de Reims Champagne-Ardenne
{Eric.Bittar | Dominique.Ploton}@univ-reims.fr

Résumé

Nous présentons une méthode d'analyse et de représentation des phénomènes biologiques se déroulant dans une série temporelle d'images 3D.

Nous réalisons la modélisation, le suivi et la visualisation d'entités intracellulaires qui se déplacent, changent de forme ainsi que de topologie.

Nous décrivons notamment comment nous avons étendu l'utilisation d'un modèle déformable surfacique, le delta-snake, pour résoudre les difficultés rencontrées dans le cadre de données 4D. Cette méthode est illustrée par des résultats expérimentaux sur des données réelles obtenues par microscopie confocale.

Mots Clef

Imagerie biomédicale, modélisation 4D, visualisation 4D, modèle déformable, suivi de caractéristiques.

Abstract

We present a method to analyze and represent the biological phenomena that occur in a series of 3D images.

Evolving intracellular entities that change shape and topology are modeled, tracked along time and visualized.

We describe how we extended the use of a deformable surface-mode called delta-snake to solve the difficulties that arise in the 4D framework. The method is illustrated by experimental results on real confocal cell data.

Keywords

Biomedical imaging, 4D modeling, 4D visualization, deformable model, feature tracking.

1. Introduction

Grâce aux récents développements du génie génétique, les biologistes cellulaires sont capables de créer des lignées de cellules qui expriment des protéines qui sont le résultat de la fusion entre une protéine d'intérêt et une protéine autofluorescente : la GFP.

En observant de telles cellules vivantes, il est possible d'étudier leur comportement spatio-temporel. Dans cet article nous étudions ainsi le devenir de ces protéines fusionnées sous l'action de médicaments anticancéreux.

La complexité spatiale des données que l'on obtient induit la nécessité d'une modélisation qui permette aux biologistes de comprendre, décrire et expliquer ce qui se passe. C'est pourquoi nous avons construit un outil basé sur l'utilisation spatio-temporelle d'un modèle déformable dont nous présentons l'application au suivi et à la représentation d'objets dont la forme et la topologie évoluent au cours du temps.

1.1. Contexte biologique

Le nucléole est le site de synthèse et de maturation des ARN ribosomiques (ARNr) à partir de l'ADN ribosomique (ADNr). La transcription des gènes d'ADNr est réalisée par un complexe contenant l'ARN polymérase I et plusieurs cofacteurs dont UBF (Upstream Binding Factor). Récemment, il a été démontré que UBF est toujours localisé à proximité des gènes d'ADNr quand ils sont actifs (dans le nucléole) et inactifs (pendant la mitose ou sous l'action d'un inhibiteur de la synthèse d'ARNr). Ainsi, UBF apparaît comme un marqueur protéique qui peut aussi être utilisé pour localiser, en microscopie optique, les gènes d'ADNr au cours des différentes périodes de la vie de la cellule.

Au cours des dernières années, nous nous sommes intéressé à la réorganisation d'UBF au sein du nucléole, en fin de mitose et au cours de l'inhibition par l'actinomycine D de la synthèse d'ARNr. Ces études ont été basées sur l'immunolocalisation d'UBF sur cellules fixées, puis l'observation en microscopie confocale et l'analyse de la distribution 3D du marquage. Cette approche a mis en évidence la haute complexité de la réorganisation d'UBF au cours de ces phénomènes et l'utilité d'une approche 3D pour la compréhension des modifications observées.

Cependant, ces modifications ont été observées uniquement sur des images statiques obtenues à partir de cellules préalablement fixées, donc mortes.

1.2. Acquisition 4D

Dans le but d'identifier précisément le déroulement des phénomènes observés, il a été nécessaire d'identifier UBF au sein de cellules vivantes. Pour cela, des méthodes génétiques ont été utilisées pour construire un gène de fusion composé du gène d'UBF et d'une protéine autofluorescente : GFP (Green Fluorescent Protein). L'insertion de ce gène de fusion dans un plasmide puis sa transfection dans une cellule vivante conduit à la synthèse, par la machinerie cellulaire d'une protéine de fusion fonctionnelle constituée de la protéine UBF couplée à la protéine fluorescente (UBF-GFP). Cette technique nous permet d'observer directement, dans des cellules vivantes, la présence de grandes quantités d'UBF-GFP sous forme de sphères de 0.3 à 0.6 μm de diamètre exclusivement situées au sein du nucléole.

Dans le but d'obtenir une bonne résolution spatiale et temporelle, chaque cellule est observée au travers de 40 sections optiques, toutes les 5 minutes pendant plusieurs heures (la résolution spatiale du microscope confocal est de 0.2 μm en X, Y et de 0.5 μm en Z). Cette approche nous a permis de suivre le devenir 4D d'UBF dans des cellules vivantes dans l'optique de comprendre la réorganisation du nucléole au cours de la ségrégation des composants nucléolaires induite par l'inhibition de la synthèse des ARNr par l'actinomycine D.

1.3. Comprendre, décrire et expliquer

Pour le biologiste cellulaire, le but d'une telle étude est de décrire et de comprendre comment les structures évoluent au cours du temps. Cela nécessite de pouvoir :

- visualiser l'évolution des structures en 3D à chaque étape de l'expérience
- sélectionner une structure donnée afin d'observer son comportement par rapport aux autres (fusion, séparation, ...)
- mesurer des paramètres comme la forme, le volume et le nombre de structures, la distance relative des unes par rapport aux autres.
- modéliser les trajectoires, et calculer les vitesses de déplacement absolues et relatives
- Analyser les résultats obtenus en faisant varier les conditions expérimentales.

Et à la suite de ce travail d'expérimentation et de modélisation, il s'agit de présenter les résultats de manière à pouvoir les expliquer et les illustrer de manière explicite.

1.4. Les difficultés intrinsèques

La nature volumique des données pose d'emblée la question de la segmentation des structures qui y sont contenues.

Cette opération nécessite une évaluation soignée afin de garantir le résultat de la segmentation, ou au moins d'en borner l'erreur. Or les structures que nous mettons en évidence sont à découvrir à la fois d'un point de vue modélisation informatique et d'un point de vue

biologique. La validation de la segmentation n'a donc pas de référentiel biologique auquel se rapporter, et elle ne peut pas s'effectuer automatiquement. Une méthode automatique de segmentation ne montrera que ce pourquoi elle a été conçue, et n'est pas adaptée à la phase d'expérimentation biologique dans laquelle nous nous situons. C'est pourquoi nous avons choisi de valider notre travail par l'appréciation des experts biologistes. Encore faut-il qu'ils puissent eux aussi avoir un élément de comparaison. Nous avons été amenés à développer un outil qui associe modélisation des structures et visualisation des données, afin que la qualité de la reconstruction puisse être évaluée par la perception des informations contenues dans les volumes.

Avec l'acquisition d'une série de volumes au cours du temps (typiquement une centaine), la quantité de données obtenue devient très importante et rend le traitement plus ardu, en nécessitant des outils rapides et efficaces. La dimension temporelle apporte son lot de contraintes spécifiques : comment extraire des informations sur un phénomène qui évolue ? Comment donner à voir en un instant un processus dynamique ? De plus, les conditions spécifiques de l'acquisition peuvent produire des mouvements non désirés [5], par exemple du fait des vibrations causées par des personnes qui se déplacent à côté du microscope confocal, ou lorsque la lamelle de verre sur laquelle les cellules sont préparées bouge.

L'acquisition d'images 4D permet d'obtenir des informations dont la dimension correspond réellement à la dimension des phénomènes tridimensionnels qui se déroulent au cours du temps. La représentation de l'information, par contre, est principalement conçue pour un support 2D, le papier ou l'écran, par exemple. Il s'agira donc de fournir des transformations intelligentes du 4D vers le 2D, en gardant la possibilité d'utiliser le temps pour produire des animations ou des représentations interactives.

Dans les sections suivantes, nous allons présenter deux méthodes d'analyse et de représentation 4D, qui sont basées l'une sur des coupes et des projections, et l'autre sur l'extraction spatio-temporelle des données. La Figure 1 présente les traitements qui sont effectués dans les deux cas, et les types de données qui correspondent. Nous introduirons différents modes de représentation de l'information, en mettant en évidence l'intérêt de l'interactivité et de la représentation symbolique. Nous illustrerons ensuite nos méthodes sur des images confocales réelles de cellules vivantes, et nous discuterons des avantages et des limites de ces méthodes au regard de notre but, avant de conclure et d'énoncer les perspectives de ce travail.

2. Réduction à un volume 3D

Nous allons présenter ici les deux opérations que nous utilisons pour réduire les données 4D à un volume 3D, et les modes de représentation que nous appliquons.

2.1. Coupes et projections

La coupe orthogonale dans un volume 4D consiste simplement à choisir un des paramètres qui correspondent aux dimensions $\{x, y, z, t\}$ et à lui donner une valeur constante. Le choix le plus courant consiste à étudier les données pour une valeur fixée du temps t .

L'opération de projection que nous effectuons consiste à obtenir une image 2D pour chaque volume $\{x, y, z\}$ à un instant donné, en intégrant les données suivant un axe, l'axe z par exemple. Nous avons choisi de le faire en utilisant la méthode de Projection du Maximum d'Intensité. L'ensemble des images 2D obtenues est utilisé pour construire un nouveau volume 3D en $\{x, y, t\}$, comme l'illustre la Figure 7.

Ce mode de représentation ne peut être utilisé qu'à titre d'indication, car il induit une perte d'informations du fait de l'opération de projection, qui peut occulter ou amalgamer un certain nombre d'objets. Il permet cependant lorsque l'on choisit correctement ses conditions d'utilisation, de mettre en évidence les changements topologiques qui se produisent au cours du temps.

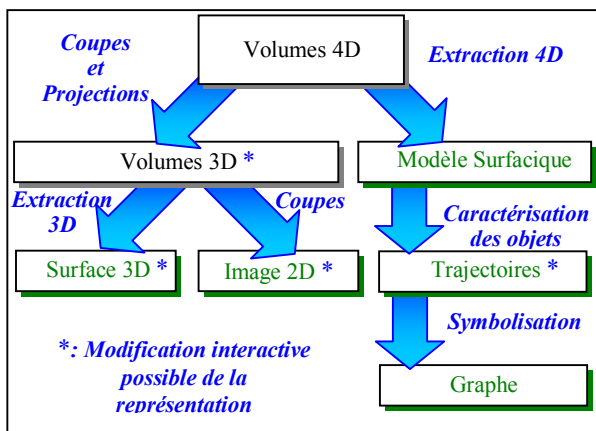


Figure 1: Traitements et données. Les cadres verts indiquent les modes de représentation, qui peuvent être combinés pour montrer ce qui se passe à l'intérieur des cellules.

Après avoir effectué ces opérations, nous obtenons des volumes 3D « classiques », auxquels nous pouvons appliquer les méthodes de représentation habituelles, telles que le calcul d'isosurfaces ou le rendu volumique direct, et comparer leurs apports effectifs pour analyser et interpréter les informations contenues dans les séries.

2.2. Extraction d'une isosurface

L'extraction d'une isosurface est une technique performante pour illustrer les structures internes dans des champs de données volumiques. De nombreux systèmes

dont le notre utilisent l'algorithme du Marching Cubes, qui a été introduit par Lorenson et Cline [10] pour traiter des données médicales. Dans notre cas, nous calculons les isosurfaces pour une valeur aux différents instants, et nous les affichons sous la forme de surfaces semi-transparentes, ce qui donne une première approche pour étudier la localisation des spots autofluorescents.

Le rapport signal sur bruit des images de microscopie confocale est bon, et il rend assez aisé le choix des seuils de caractérisation des surfaces d'intérêt. Ce choix ne peut cependant se faire qu'avec la culture du biologiste puisque dans les conditions particulières de notre étude, la valeur du seuil varie dans les différentes acquisitions au cours du temps.

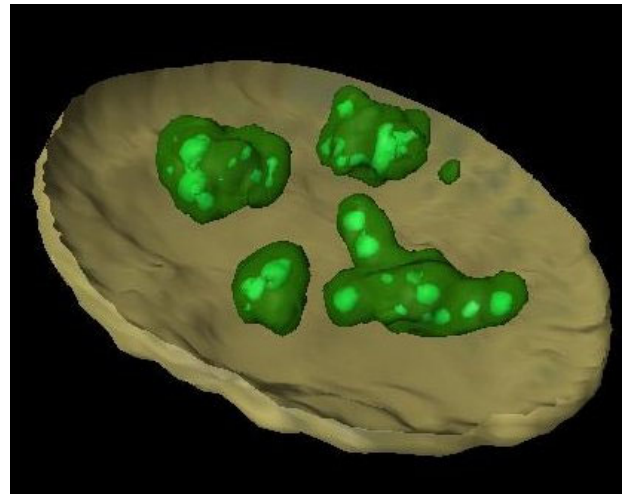


Figure 2: Rendu surfaccique d'un volume 3D correspondant à un temps spécifique, pour trois différents niveaux : l'enveloppe nucléaire (qui est partiellement représentée pour la visualisation), 4 nucléoles, et de nombreux spots d'UBF-GFP.

La frontière externe du noyau des cellules correspond à une première valeur de seuil, et les spots autofluorescents correspondent à une deuxième valeur de seuil, comme représenté Figure 2.

L'avantage principal de cette représentation est que les utilisateurs peuvent interactivement modifier les paramètres de vue de la scène virtuelle, changer les isovaleurs et les paramètres d'opacité dans chaque volume, et déplacer le curseur du temps pour réaliser une animation qui améliorera la compréhension spatiale des données.

La Figure 2 montre la représentation de trois sortes différentes d'objets dans la cellule, qui correspondent à trois niveaux d'isosurfaces dans le volume 3D. En réglant les propriétés matérielles des surfaces (couleur, opacité, réflexion diffuse et spéculaire), on améliore la perception de la forme des différentes structures.

L'inconvénient de cette représentation est qu'elle ne montre aucune information en dehors des surfaces, alors que deux isosurfaces peuvent être significativement différentes, bien que calculées à deux isovaleurs proches.

2.3. Rendu Volumique Direct

Contrairement à la précédente approche, les techniques de Rendu Volumique Direct (RVD) [9] [8] exploitent les données des images sans requérir d'intermédiaires géométriques, que sont par exemple les frontières. En utilisant le placage de textures, qui est une des méthodes de RVD, on obtient non seulement une image 3D de haute qualité, mais aussi une vitesse de rendu qui permet une interaction en temps réel avec les données 3D. Nous utilisons dans notre implémentation les capacités des cartes accélératrices graphiques pour calculer le rendu de coupes parallèles au plan de la caméra virtuelle en utilisant des textures 3D, et en prenant en compte un éclairage directionnel [3] [1] [12].

Le principe de cette technique est de considérer chaque plan de rendu comme représentant une coupe dans le volume de données. L'épaisseur ε de chaque coupe est définie comme la distance totale entre les plans divisée par le nombre total de plans. On calcule une carte de textures 3D à partir des données et une fonction de transfert qui dépend des niveaux que l'on veut mettre en valeur, dans laquelle on incorpore ε , et la valeur d'opacité par unité de volume que l'on désire. Les plans de rendus sont ensuite affichés du fond vers l'avant.

Dans notre implémentation, nous renforçons la compréhension spatiale des données en combinant la représentation en RVD avec la représentation d'isosurfaces. Nous obtenons des images d'une qualité comparable au ray-casting à une fréquence de rendu qui permet une manipulation interactive des données. De plus, nous pouvons générer des animations pour montrer le cumul des changements au cours du temps.

La fonction de transfert nécessite cependant des ajustements qui peuvent être délicats lorsque l'on désire mettre en évidence certains objets particuliers dans la scène.

3. Extraction spatio-temporelle

A la place de chercher à réduire les données 4D à un volume 3D, nous présentons dans cette section un deuxième type de méthodes de traitements qui est spécifiquement adapté aux suivi de structures en évolution au cours du temps qui sont l'objet de changements de topologie comme des fusions et des divisions. L'idée est de modéliser les structures qui nous intéressent et leur évolution à l'aide d'un outil 4D qui sera également adapté pour la quantification des données et leur représentation. Nous allons présenter cet outil et les modes de représentation qui illustrent les phénomènes spatio-temporels significatifs, puisqu'à partir de la modélisation nous obtenons la surface des objets au cours du temps, ainsi que l'ensemble de leurs trajectoires et le graphe des événements topologiques.

3.1. Un modèle déformable surfacique 4D

L'extraction des informations significatives nécessite de s'opérer dans un cadre temporel. En effet, la cohérence spatiale des objets en évolution est difficile à obtenir si l'on ne considère les volumes qu'à un temps donné. Il ne suffit pas d'utiliser la mise en correspondance des objets entre un volume et le volume suivant au cours du temps pour la reconstruction des structures, il faut également utiliser la cohérence temporelle des données. C'est pour cela que nous avons mis au point un modèle déformable spatio-temporel, qui utilise la cohérence temporelle de la forme et de la vitesse de déplacement des objets.

Ce modèle a été introduit en 3D par Lachaud et Montanvert 0, et il a été porté en 4D par Benassarou et al [1]. Il est appelé δ -snake d'après le paramètre δ qui régit sa structure. Il s'agit d'un modèle déformable surfacique 4D qui peut changer de topologie au cours du temps. Il est basé sur un maillage triangulaire que régissent des règles de régularité et de non pénétrabilité. Des opérateurs

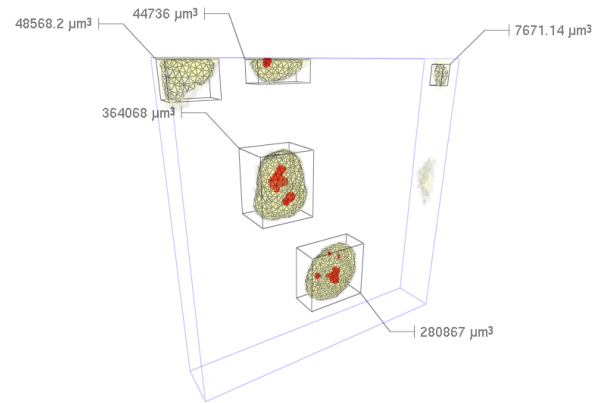


Figure 3: A un temps t donné, le modèle spatio-temporel met en évidence cinq nucléoles.

eulériens veillent à la régularité du maillage, en garantissant que les longueurs de toutes les arêtes sont similaires, à savoir comprises entre δ et $2,5*\delta$. Si une arête est trop longue, un nouveau sommet est créé en son milieu. Si deux sommets voisins sont trop proches, ils sont fusionnés. Deux opérateurs non-eulériens traitent les auto-collisions du modèle et garantissent une distance minimale ($2,5/\sqrt{3}*\delta$) entre deux sommets non-voisins, en produisant des changements de topologie, des fusions ou divisions locales de la surface.

Le modèle déformable évolue suivant un schéma classique de minimisation d'énergie. Cette énergie est la composition de deux termes. Le premier appelé énergie externe est lié aux données à reconstruire : la série des images 3D acquises au cours du temps. Le second, l'énergie interne, est associée aux propriétés géométriques du modèle. L'expression locale de cette énergie s'établit pour chaque sommet v du maillage M sous la forme :

$$E(v) = \alpha.E_{\text{ext}}(v) + \beta.E_{\text{int}}(v), \text{ avec } \alpha+\beta=1$$

Les paramètres α et β permettent de faire un compromis entre un maillage plutôt influencé par les données de l'image à travers l'énergie externe E_{ext} , et un maillage plutôt régulier déterminé par l'énergie interne E_{int} . Ils sont empiriquement fixés à $\alpha=2/3$ et $\beta=1/3$.

L'obtention d'une solution peut se faire dans un cadre dynamique, dont le formalisme nécessite des informations supplémentaires, et requiert des calculs d'intégration numérique coûteux.

La répartition de la masse, d'une part, et les efforts internes induisant le déplacement des objets, d'autre part, sont dans ce cas des paramètres nécessaires, mais sur lesquels il est hasardeux de faire des hypothèses. Nous avons donc choisi de nous placer dans un cadre quasi-statique, en considérant que les déplacements sont relativement petits d'un volume au suivant. Ce cadre a deux avantages. Il permet d'une part de s'abstraire de la nécessité d'obtenir des informations supplémentaires, et d'autre part, il permet d'utiliser une méthode itérative efficace (compatible avec le temps réel) de minimisation de l'énergie.

L'énergie externe est exprimée sous la forme d'un champ de pression algébrique. Nous utilisons ainsi uniquement les valeurs d'intensité de l'image, sans avoir à calculer leur gradient.

Si l'on nomme I cette image, iso l'isopotential recherché et $\mathbf{n}(v)$ le vecteur normal à un sommet v du maillage M , on peut calculer la force locale qui dérive de cette énergie externe :

$$\forall v \in M, F_{\text{local}}(v) = \text{clamp}\{-1, 1\}(\text{iso} - I(v)) * \mathbf{n}(v)$$

Nous prenons en compte également la résultante globale de ce champ pression, en considérant chaque composante connexe C :

$$\forall C \subset M, F_{\text{forme}}(C) = 1/\text{card}(C) \cdot \sum_{v \in C} (F_{\text{local}}(v))$$

La force externe est ainsi exprimée comme la combinaison linéaire de ces deux termes :

$$\forall C \subset M, \forall v \in C, F_{\text{ext}}(v) = \gamma \cdot F_{\text{local}}(v) + \mu \cdot F_{\text{forme}}(C),$$

avec $\gamma + \mu = 1$

Le premier terme correspond empiriquement à une déformation locale, et le second à une transformation rigide. L'énergie interne correspond à la tension de la surface. Elle se dérive en une force $F_{\text{int}}(v)$, qui tend à ramener v vers le barycentre de ses voisins.

Dans notre cadre quasi-statique, nous traduisons directement les différentes forces en terme de déplacement pour chaque point de la surface. L'application de ces déplacements mène à un nouvel état qui ne satisfait pas nécessairement les contraintes constitutives du δ -snake. Le maillage est donc régularisé en appliquant les opérateurs présentés dans la section précédente, avant de procéder au calcul de l'énergie de l'itération suivante, et ce jusqu'à la convergence du modèle.

Au travers du réglage des valeurs de γ et de μ , il est possible de régler la déformabilité du δ -snake. Plus μ est grand, plus la transformation appliquée à l'objet est rigide. A l'extrême, quand $\mu=1$, on se trouve dans une situation où tous les sommets de l'objet subissent exactement la même transformation. L'objet n'est plus déformé, il est seulement déplacé. Au contraire, lorsque $\mu=0$, l'objet devient totalement libre de ses déformations et il n'y a plus aucune homogénéité. L'utilisation judicieuse de ce terme permet d'agir suivant un mécanisme de lissage temporel [11].

L'initialisation du δ -snake peut s'effectuer selon diverses méthodes semi-automatiques comme automatiques. Notre domaine d'application se prêtant relativement bien aux méthodes automatiques, nous avons retenu une méthode utilisant comme état de référence un maillage obtenu par Marching Cubes. A partir de sa forme de départ, le δ -snake converge vers la forme à atteindre au bout de quelques dizaines d'itérations. C'est ce principe, répété successivement entre les différentes images de la série, qui permet de reproduire la continuité des phénomènes observés. Sous l'hypothèse que les structures évoluent à vitesse constante, nous opérons un rééchantillonnage temporel des positions obtenues à partir des étapes de convergence du modèle, afin de calculer l'évolution des formes au cours du temps.

3.2. Analyse multi-niveaux

Le principe de la reconstruction d'un objet dans les données 4D peut-être appliqué à toutes les sortes d'objets, et même à des objets inclus dans d'autres. La Figure 4 montre la reconstruction de deux niveaux qui correspondent à l'enveloppe nucléolaire et à deux

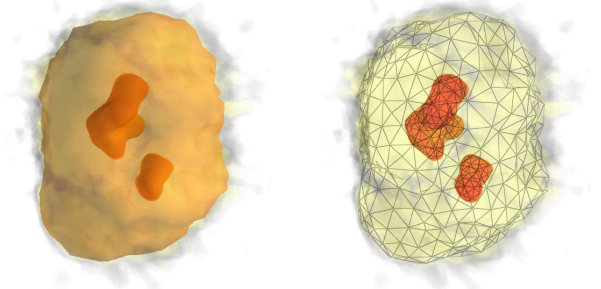


Figure 4: Reconstruction de deux niveaux à l'aide du modèle déformable surfacique. Les images montrent également la combinaison du rendu volumique et de la représentation surfacique, qui est en mode plein à gauche, et en mode filaire à droite.

ensembles de protéines UBF-GFP.

Lorsque les nucléoles se déplacent rapidement, ces mouvements doivent être pris en compte pour corriger les mouvements des protéines UBF-GFP qui sont contenues dans les nucléoles. Notre modèle permet cette correction,

en utilisant les trajectoires des nucléoles comme repère de référence pour le calcul du mouvement des protéines.

3.3. Fixer un paramètre

Grâce à notre modèle déformable 4D, nous avons à notre disposition un grand nombre de paramètres que nous pouvons fixer afin d'étudier l'évolution des autres éléments. Non seulement on peut fixer le temps et observer les structures à un instant donné, mais on peut par exemple fixer la position d'une protéine, et observer l'évolution des autres protéines dans le repère de la protéine fixée, ou encore fixer la position du nucléole ou du noyau d'une cellule, et observer les trajectoires des protéines dans ce repère local.

3.4. Représentation symbolique

Quelque soit le schéma de visualisation choisi, la représentation directe des structures qui ont été extraites des données n'est pas forcément la plus pertinente pour comprendre les phénomènes qui se déroulent dans les données. Un mode de représentation symbolique peut être plus adapté. Il pourra par exemple s'agir de la représentation à l'aide de vecteurs d'une application de dynamique des fluides, ou dans notre cas de la représentation de la trajectoire des objets que l'on suit. Il est également significativement illustratif de pouvoir visualiser les valeurs quantitatives que l'on a extraites et qui caractérisent l'évolution, comme le volume de chaque spot UBF-GFP, ou le nombre de ces spots.

La Figure 3 montre les valeurs numériques du volume de

déroulé, c'est-à-dire qu'il est intégré à une dimension spatiale, pour obtenir une représentation spatio-temporelle 3D hybride, comme $\{x, y, z+t\}$. Cette approche a l'avantage de mieux présenter les variations des données au cours du temps. Elle peut être comparée au mode de projection présenté en 2.1, puisqu'on a une idée de toute l'évolution sur une représentation statique, mais elle a l'avantage de ne pas altérer les données au cours du traitement. Ce que l'on observe est l'évolution du centre de masse des objets.

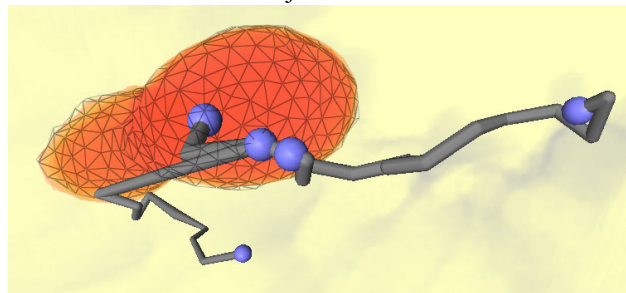


Figure 6: Deux protéines ont fusionné en une seule.

4. Utilisation en routine

Notre but est de fournir une représentation des données 4D qui soit à la fois simple et pertinente. Nous avons donc choisi de combiner les différents modes de représentation pour améliorer la compréhension des données et pour donner à l'utilisateur le contrôle interactif de la visualisation.

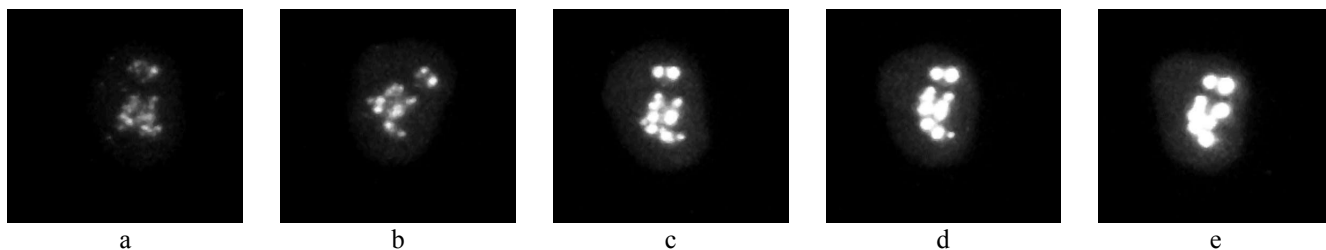


Figure 5: Projections MIP 2D à 5 temps différents durant le traitement avec l'Actinomycine-D.

chaque nucléole dans une petite étiquette qui est reliée à la boîte englobante de l'objet. La représentation symbolique principale est la visualisation des trajectoires des objets. Grâce à notre modèle déformable spatio-temporel, nous calculons les trajectoires de tous les objets reconstruits, en incorporant les changements de topologie. Ces calculs permettent d'obtenir à la fois la représentation spatiale de l'évolution des objets et le graphe associé [4]. Les trajectoires sont représentées suivant trois modes différents, selon les spécifications de l'utilisateur. Leur représentation normale est composée de cylindres qui illustrent l'évolution des objets, et de petites sphères localisées aux lieux des ruptures de topologie. Cette représentation est enrichie en modifiant le rayon des cylindres en fonction du volume des objets (voir Figure 6). Dans le dernier mode de représentation, le temps est

4.1. Combinaison de plusieurs approches

Les limitations de chaque méthode peuvent être dépassées en combinant les modes de représentation et les outils d'analyse présentés. Par exemple la représentation symbolique peut être ajoutée à la scène dans laquelle le nucléole est visualisé à l'aide du rendu volumique direct, et les surfaces des protéines représentées à l'aide du modèle déformable 4D, comme sur la Figure 13. Ceci permet de présenter plus d'informations sur une même image. La quantité d'informations représentées et leur mode de présentation doivent cependant être choisis de manière congruente, pour éviter la confusion.

4.2. Interactivité

Ces nouvelles procédures d'investigation permettent aux biologistes cellulaires de découvrir des phénomènes inconnus. L'interactivité est donc de première importance puisqu'elle permet aux scientifiques d'explorer ces phénomènes sous différents points de vue, et d'observer les structures avant et après les moments clé des phénomènes significatifs.

5. Résultats

5.1. Matériel et Méthodes

Des cellules cancéreuses humaines (cellules KB), issues d'un carcinome buccal et adhérentes, sont mises en culture stérilement, sur des lamelles de verre, en présence d'un milieu de croissance adéquat. Elles sont ensuite transfectées par les plasmides contenant le gène de fusion UBF-GFP. 24 heures après la transfection, les lamelles sont montées dans une chambre d'incubation stérile, perfusée en milieu et équipée d'un contrôleur de température, permettant l'observation en microscopie confocale. Des images sont réalisées avec un microscope confocal Biorad MRC 1024 équipé d'un objectif PlanApo x63, ayant une ouverture numérique de 1.4. Les conditions d'acquisition ont été optimisées pour réaliser une série « z » (contenant 40 sections optiques) toutes les 5 minutes durant une longue période (8 à 10 heures).

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur de la transcription des ARNr, l'actinomycine D sur la réorganisation des sites nucléolaires contenant la protéine de fusion UBF-GFP. Après une période de 30 minutes sans inhibiteur, les cellules sont perfusées avec une solution contenant 50 ng/ml d'inhibiteur pendant 2 heures. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu sans actinomycine D, pendant 5h30. Pendant l'expérience, 100 séries « z » sont collectées pour chaque cellule.

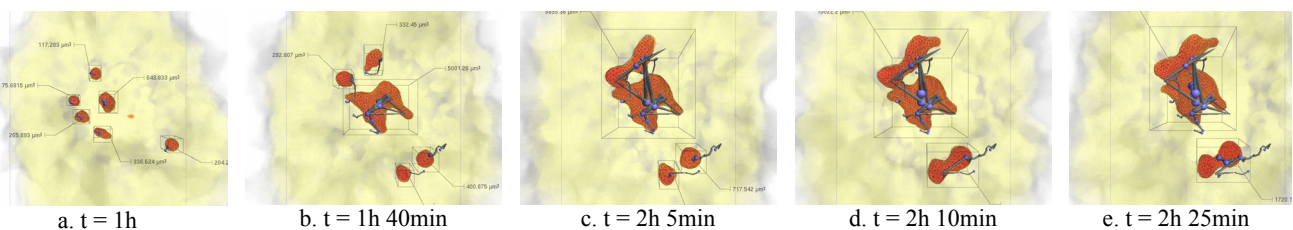


Figure 8: Modèle déformable spatio-temporel et trajectoires à 5 instants différents durant le traitement avec l'Actinomycine-D.

5.2. Reconstruction par coupe et projection

Pour chacune des 100 séries « z » obtenues au cours d'une expérience pour une même cellule, une projection des 40 sections optiques en maximum d'intensité a été réalisée le long de l'axe Z.

Ces 100 images ont ensuite été utilisées pour créer un nouveau fichier qui a été traité de deux manières différentes. Dans une première approche, une séquence a été réalisée par présentation successive des images, dans

le but d'observer les changements au cours du temps. Dans une seconde approche, les différentes positions de chacun des objets au cours du temps ont été reliées les unes aux autres en utilisant une méthode de rendu surfacique : cette méthode a permis de visualiser chaque objet sous forme d'un cylindre dont les déformations rendent compte, de manière explicite, des modifications majeures survenues durant l'expérience (déplacement en X, Y; scission ; fusion...).

La Figure 7 et la 9 ont été obtenues grâce au logiciel Amira [13].

Projections 2D à un temps donné

Sur la Figure 6, une cellule vivante, observée en microscopie confocale, est montrée à cinq temps différents. Pour chaque temps, la projection de 40 sections est visualisée. Avant traitement par la drogue, les spots lumineux correspondent approximativement à quinze sites nucléolaires (0.4µm de diamètre), contenant la protéine UBF-GFP fluorescente, répartis dans trois nucléoles. Durant et après la perfusion, la luminosité et la taille des spots augmentent alors que leur nombre diminue.

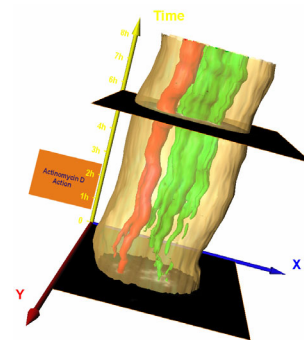


Figure 7: Représentation surfacique des projections 2D+t.

Projections 2D au cours du temps

Un fichier de 100 projections a été créé et utilisé pour construire un film. Ensuite, grâce à une méthode de visualisation en rendu surfacique (Figures 7 et 9), nous obtenons des cylindres qui nous permettent de visualiser les changements intervenant sur les spots choisis et pour lesquels il est utile de comprendre comment et quand ils ont été modifiés par l'action de la drogue.

Sur la Figure 7, les contours de la projection sont visualisés au cours du temps. Le cylindre jaune transparent correspond au noyau. A l'intérieur, les cylindres verts et rouges montrent l'évolution des spots au cours du temps. Il apparaît alors clairement que les premiers changements interviennent entre trente minutes et une heure après injection de la drogue. Plus tard, les changements sont très évidents. Dans la Figure 9, le contour des spots verts et rouges sont montrés: par rotation des volumes, il est possible de mettre en évidence la fusion de deux spots (identifiés en rouge) deux heures après le début de l'expérience et de suivre les autres spots qui fusionnent au cours du temps. Cependant, ce mode de visualisation présente une limitation puisque seules les structures non localisées sur le même axe z peuvent être observées durant l'expérience.

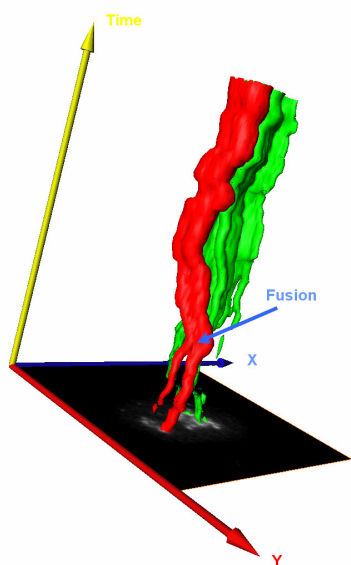


Figure 9: Selon un autre point de vue, la fusion est visible.

5.3. Modèle déformable spatio-temporel

Les mêmes données ont été analysées avec notre modèle déformable et visualisées avec les modes que nous décrivons dans la section 3. L'extraction de la surface 4D prend environ 5 minutes pour les 100 volumes sur un PC équipé d'un Pentium IV cadencé à 1.2 GHz. Une fois ce calcul effectué, l'utilisateur visualise les informations de manière interactive à l'aide d'une carte graphique nVidia GeForce4 Ti 4200. Les spots colorés en rouge sur la Figure 9 correspondent à ceux situés au bas de la Figure 8. On observe que la fusion des spots est visible à la fois au niveau des surfaces et au niveau des trajectoires.

Ce phénomène a lieu entre 2h5min et 2h10min après le début de l'expérience (figures 8b et 8c). La fusion est aussi visible sur le graphe de la figure 11 et sur la figure 13, où le temps est intégré à la dimension z des trajectoires.

6. Discussion

L'imagerie tridimensionnelle de cellules vivantes exprimant une protéine fluorescente est désormais possible sur plusieurs heures grâce à l'utilisation de la microscopie confocale. Cette approche permet aux biologistes d'étudier des changements complexes dans la localisation spatiale de structures fluorescentes pendant l'action de médicaments anti-cancéreux, par exemple. En raison de l'impressionnante quantité de données, le traitement d'images classique s'avère incapable d'extraire des données pertinentes à partir des phénomènes observés.

Dans ce travail, nous avons abordé différentes méthodes de traitement des données 4D. Ainsi, nous avons montré que les projections en z des séries temporelles peuvent être utilisées pour créer des animations ou des cylindres.

Cette approche est utile pour montrer rapidement les données et pour décrire les principales modifications des structures quand elles ne sont pas situées sur le même axe des z. Cependant, ce traitement est trop lent et trop limité en terme de résolution.

En conséquence, il a été nécessaire de développer de nouvelles solutions logicielles pour facilement décrire et comprendre le comportement, en 3D, au cours du temps, de structures complexes.

Nous avons proposé un modèle déformable spatio-temporel qui permet la représentation de l'évolution des objets et qui offre différents modes de visualisation. On peut constater sur la figure 8 qu'il n'est pas facile de qualifier l'évolution des spots de la partie supérieure de l'image. Parfois, de fausses fusions ont lieu : quand deux spots s'approchent l'un de l'autre, ils peuvent être fusionnés par le modèle déformable. C'est pourquoi la résolution du modèle est aussi importante pour la reconstruction. En général, nous choisissons une longueur δ équivalente à la dimension d'un voxel.

Parallèlement au calcul de l'évolution d'un objet, les positions relatives des autres objets sont obtenues. Ceci est très utile pour mettre en avant les déplacements relatifs. Sur la figure 12, nous montrons que, sur l'intervalle de temps considéré, les mouvements des deux spots sont très similaires. Ceci est sans doute dû à un bruit extérieur non désiré. Montrer la trajectoire d'un spot par rapport à la position d'un autre comme sur la Figure 10 est un moyen de filtrer le bruit. Nous avons l'intention de généraliser cette méthode pour le calcul est la visualisation des déplacements relatifs.

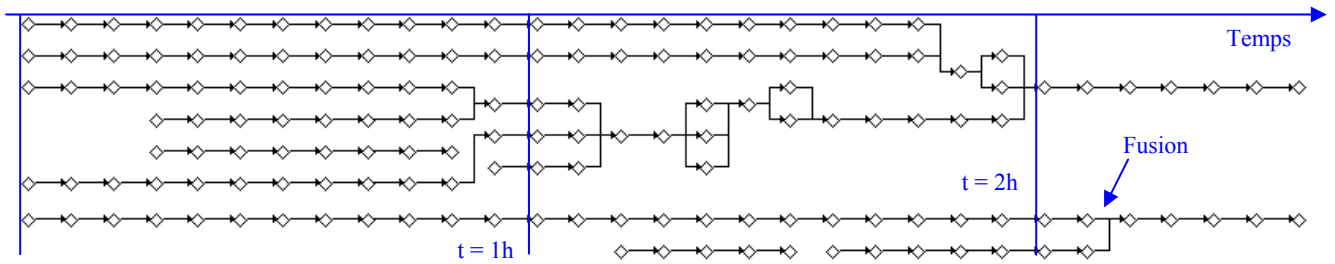


Figure 11: Graphe symbolique de l'évolution automatique des données durant les premières 2 heures 30 minutes. Les fusions y sont visibles. Chaque pas de temps représente 5 minutes.

7. Conclusions et perspectives

Dans cet article, nous avons proposé un schéma général pour représenter, modéliser, et analyser de manière interactive l'évolution au cours du temps de structures 3D dont la particularité est de changer à la fois de forme et de topologie.

Des modes de représentation différents ont été utilisés, seuls ou de manière combinée. Nous avons utilisé des isosurfaces pour illustrer des structures internes dans les données volumiques. Des méthodes de rendu volumique direct ont permis de présenter l'ensemble des structures des objets tridimensionnels d'une image. Des représentations symboliques ont été proposés pour visualiser l'évolution des objets et les événements topologiques. La représentation des trajectoires a permis de mettre en évidence les déplacements relatifs des objets dans leur environnement. Nous avons obtenu des résultats pertinents à partir de données 4D complexes, grâce à notre modèle déformable temporel.

Nous pouvons donc décrire, comprendre et expliquer des phénomènes 4D complexes qui se déroulent dans les cellules vivantes que nous avons étudiées sous l'action d'une drogue.

Nous travaillons actuellement sur les aspects hiérarchiques de notre modèle, et désirons étendre nos traitements aux volumes obtenus en multi-marquage, ainsi que sur la prise en compte de plusieurs modalités d'imagerie.

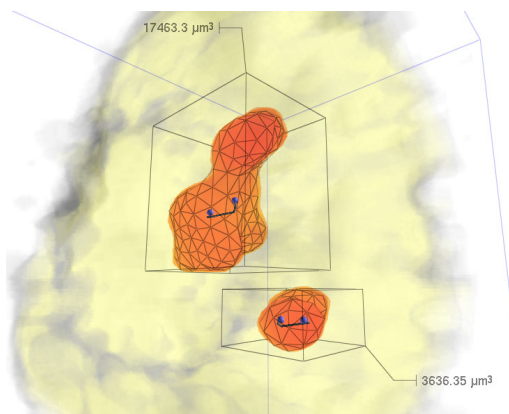


Figure 10: Trajectoires montrant des perturbations externes.

Remerciements

Ce travail est soutenu par des fonds de l'ARERS et de l'ARC (contrat N°4497), de Ligue Régionale de l'Aube et de la Ligue Régionale de la Marne à D.P.

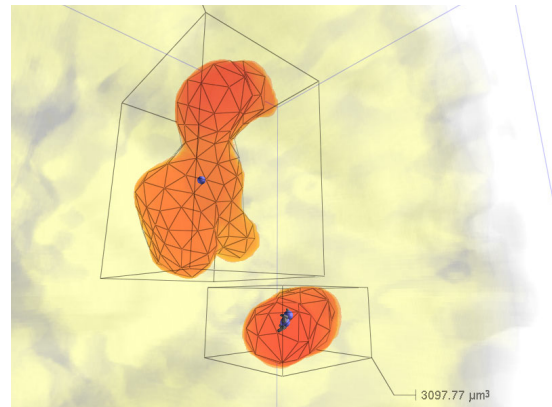


Figure 12: Le spot en haut à gauche sur l'image est fixé, et il est utilisé comme référence pour la trajectoire du spot qui est en bas à droite.

Bibliographie

- [1] A. Benassarou, J. De Freitas-Caires, E. Bittar and L. Lucas. An Integrated Framework to Analyze and Visualize the Evolution of Multiple Topology Changing Objects in 4D Image Datasets. *Proc. Vision Modeling and Visualization 2002*, Erlangen Germany, pp 147-154, 2002
- [2] C. Bruley. Analyse des Représentations Graphiques de l'Information - Extensions aux Représentations Tridimensionnelles. *PhD thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, France, 1999.* (in french).
- [3] B. Cabral, N. Cam and J. Foran. Accelerated volume rendering and tomographic reconstruction using texture mapping hardware. *ACM Symposium on Volume Visualization*, 1994.
- [4] J. de Freitas-Caires, A. Benassarou, E. Bittar and L. Lucas. *Interactive Poster: A 4D Deformable Model To Visualize Time-Varying Volumetric Datasets.* IEEE Visualization 2002, Posters Compendium, pp80-81, 2002
- [5] W. de Leeuw and R. van Liere. Case Study: Comparing Two Methods for Filtering External Motion in 4D

Confocal Microscopy Data. *Joint Eurographics – IEEE TCVG Symposium on Visualization*, Grenoble, France, 2003.

- [6] C. Klein et al.. The Three-Dimensional Study of Chromosomes and Upstream Binding Factor-Immunolabeled Nucleolar Organizer Regions Demonstrates Their Non-Random Spatial Arrangement During Mitosis. *Mol Biol. Cell*, 9: 3147-3159, 1998
- [7] J-O. Lachaud and A. Montanvert. Deformable Meshes with Automated Topology Changes for Coarse-to-fine 3D Surface Extraction. *Medical Image Analysis*, 3(2):187-207, 1999
- [8] P. Lacroute and M. Levoy. Fast volume rendering using shear-warp factorization of the viewing transform. *Computer Graphics (Siggraph'94 Proceedings)*, pp451-458, 1994.
- [9] M. Levoy. Display of surfaces from volume data. *IEEE Computer Graphics & Application*, 8(5), pp 22-37, 1988.
- [10] W.E. Lorensen and H.E. Cline. Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm. *Computer Graphics (Siggraph'87 Proceedings)*, 21(4), pp163-169, 1987
- [11] J. Montagnat and H. Delingette. Space and time shape constrained deformable surfaces for 4D medical image segmentation. *MICCAI 2000 proceedings*, pp 196--205, Pittsburgh, PE, USA, 2000
- [12] C. Rezk-Salama, K. Engel, M. Bauer, G. Greiner and T. Ertl. Interactive volume rendering on standard PC graphics hardware using multi-textures and multi-stage rasterization. *Siggraph & Eurographics Workshop on Graphics Hardware 2000*, 2000.
- [13] <http://www.tgs.com>
- [14] O. Wilson, A.V. Gelder and J. Wilhems. Direct volume rendering via 3D textures. Tech. Rep. UCSC-CRL-94-19, University of California at Santa Cruz, June 1994.

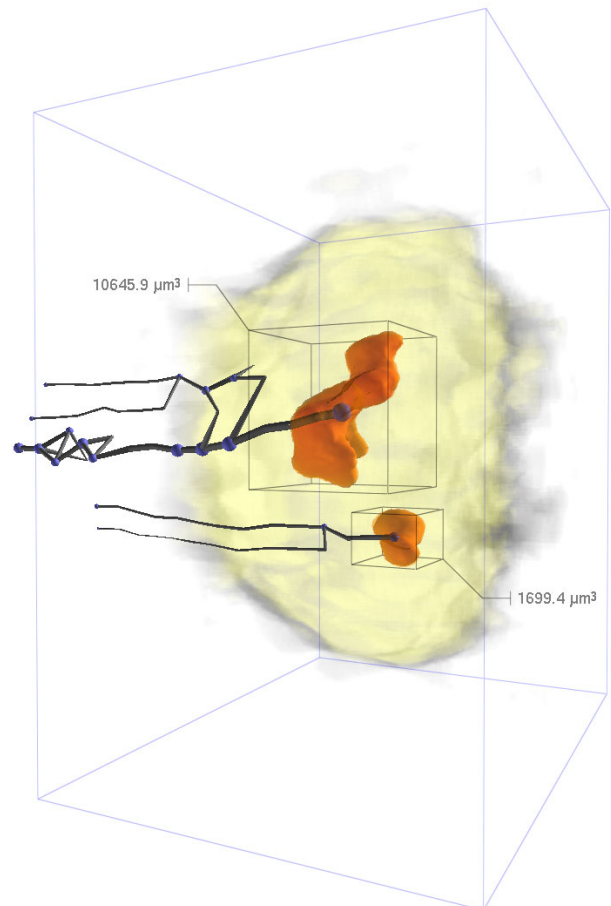


Figure 13: Trajectoires des spots entre 1h 20min et 2h 20min, le temps étant déroulé selon l'axe z. Les rayons représentent le volume des spots. La surface des spots à $t=2h20$ est représentée, ainsi que le rendu volumique du nucléole.