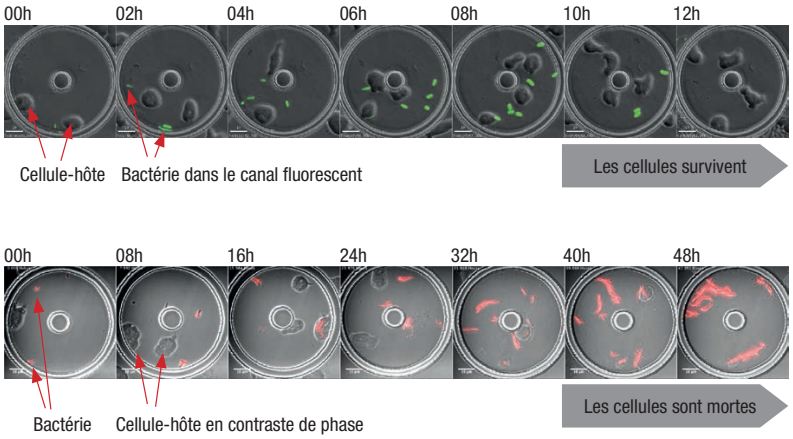
QUAND LES ALGORITHMES RÉVÈLENT LA MACHINERIE CELLULAIRE

par Daniel Sage

Comprendre et modéliser les fonctionnements cellulaires sont des enjeux cruciaux pour la santé humaine, que ce soit pour la prévention, le diagnostic médical, ou pour les thérapies. Au cœur de toutes ces recherches, l'imagerie de la cellule vivante par microscopie est devenue une pratique usuelle pour tous les biologistes. Elle est passée, en quelques années, d'une nature qualitative, simple observation du milieu vivant sur un microscope, à une nature quantitative, complexe extraction d'informations sur un ordinateur. Toutes les étapes de la bio-imagerie – l'acquisition, l'archivage intégratif, le traitement d'images spatio-temporelles, l'analyse d'images multidimensionnelles – sont numériques et très souvent automatisées. Les méthodes de calcul informatique (ou « computationnelles ») permettent non seulement d'extraire les informations pertinentes des images, mais elles permettent également de reconstruire les images à partir des mesures, comme c'est le cas pour l'imagerie en super-résolution qui permet l'observation et la quantification de composants cellulaires vivants dans leur authenticité moléculaire (cf. p. 32).

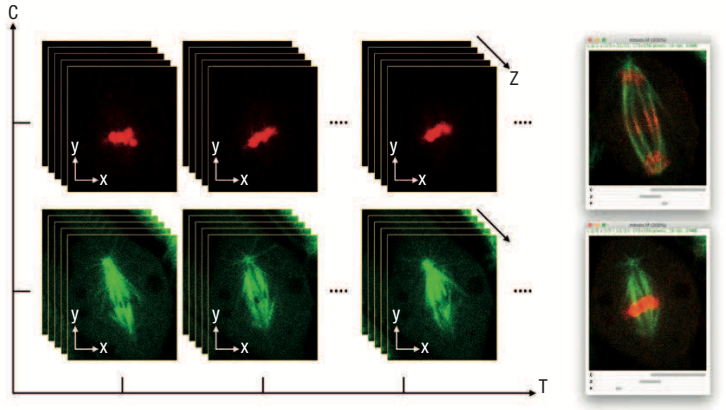


1. Imagerie des interactions *in vitro* entre des cellules-hôtes et des bactéries. Images 2D, avec une dimension temporelle et deux canaux. Les cellules-hôtes *D. discoideum* évoluent en culture. Ce sont des cellules eucaryotes (avec un noyau), modèle courant pour les études de phagocytose au comportement similaire à celui du système immunitaire mammifère. Le microscope a enregistré des images à une cadence régulière pour suivre l'évolution des infections. Deux modalités d'imagerie sont activées simultanément, la microscopie par contraste de phase pour l'observation des cellules (gris) et la microscopie par fluorescence pour les bactéries (couleur). En haut. Les deux canaux sont combinés pour montrer les bactéries (vert) en surimpression aux cellules (gris). Les *D. discoideum* sont capables d'ingérer (phagocytose) les bactéries *K. pneumoniae* (GFP) qui causent la pneumonie par infection du poumon. En bas. Les *D. discoideum* sont infectées par des agents pathogènes, les bactéries *M. marinum* (rouge), et sont détruites en une vingtaine d'heures. Source : Matthieu Delincé, Chiara Toniolo, Neeraj Dhar, Ariane Kaeppli, John McKinney, EPFL.

Pour parvenir à cette fin, une nouvelle discipline des biosciences est apparue : la bio-imagerie computationelle, qui conjugue la biologie, la biophysique, la microscopie, l'analyse numérique, le traitement du signal et la vision par ordinateur. En pleine effervescence, ce domaine de recherche transcende les progrès technologiques de ces deux dernières décennies, aussi bien du côté de la microscopie (3D, dynamique, fluorescence, super-résolution), que du côté algorithmique (optimisation, apprentissage machine*). Les défis à relever sont de taille, tant les logiciels actuels d'imagerie semblent encore bien rudimentaires pour appréhender la variabilité du monde vivant et pour faire face au flot ininterrompu de données-images multidimensionnelles (figure 1).

1 La nature multidimensionnelle des bio-images

Les techniques d'imagerie de microscopie sont omniprésentes dans les laboratoires de biologie et de neuroscience générant une gigantesque quantité d'images. Cependant, ces données numériques demeurent très loin de ce que le grand public entend par « images ». Elles sont, en effet, des images scientifiques à plusieurs dimensions allant bien au-delà de la traditionnelle représentation en deux dimensions avec ses axes X et Y (cf. p.128). Les microscopes modernes ont la capacité d'explorer d'autres dimensions, à commencer par la troisième dimension spatiale 3D, l'axe Z, en acquérant des volumes de données. Par ailleurs, pour capturer les processus dynamiques en jeu dans les cellules, la dimension temporelle est obtenue en enregistrant des images à intervalle régulier (données spatio-temporelles 4D). Ensuite, l'utilisation de traceurs fluorescents (fluorophores) apporte une dernière dimension aux bioimages. Ces fluorophores, en émettant un signal lumineux brillant, servent à localiser la présence de macromolécules auxquelles ils sont liés spécifiquement, ce qui est indispensable pour suivre *in vivo* les processus biologiques à l'intérieur de la cellule. On obtient finalement une image par longueur d'onde d'émission, en 5D (figure 2).



2. Vues de l'image 5D *mitosis* de *ImageJ*. Cette illustration montre une image 5D avec les deux dimensions X et Y de l'image, 5 plans en Z, 51 trames en T, et 2 canaux fluorescents. Sur la droite, deux vues 2D de l'image 5D sont montrées, elles sont sélectionnées par l'utilisateur au plan focal Z = 3, au début (T = 11) et à la fin de mitose (T = 33). La visualisation est en mode composite, par superposition de deux canaux couleur, rouge et vert. Source : Le lecteur est invité à télécharger le logiciel *ImageJ* du NIH (licence domaine public) pour accéder à l'image 5D *mitosis* avec la commande File → Open Samples → Mitosis. *ImageJ* s'installe en 1 minute environ.

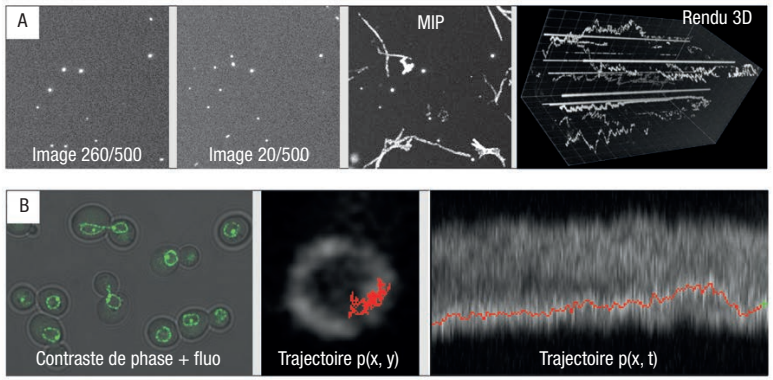
2 Les défis informatiques et les apports de l'*open source*

Les images multidimensionnelles posent des défis logistiques, technologiques et méthodologiques importants. Elles sont extrêmement volumineuses, ce qui rend les opérations numériques habituelles, telles que l'archivage, le transfert ou le partage, pénibles voire infaisables. Par exemple, une seule expérience de suivi de neurones* dans des cerveaux de larves du poisson-zèbre peut peser jusqu'à 10 téraoctets (10^{12} octets).

La visualisation des images multidimensionnelles sur un simple écran 2D relève de la quadrature du cercle. Il est possible d'obtenir des rendus volumiques 3D, mais ces vues sont peu appréciées des scientifiques car les

proportions sont perdues. Ils préfèrent travailler sur des sections orthogonales ou sur des projections 2D, comme en radiologie.

La quasi-totalité des outils développés en bio-imagerie a donc été rendue publique et gratuite, par et pour la communauté. Cette forme de travail collaboratif a permis aux chercheurs du monde entier d'être réactifs aux avancées technologiques en microscopie. Ainsi, le logiciel ImageJ et sa distribution FIJI ont été rapidement adoptés pour devenir presque universels. Des milliers de développeurs ont ajouté des scripts, des macros et des plugins en Java pour répondre à la plupart des besoins de l'analyse de bioimages. Plus récemment, on trouve de plus en plus de notebooks (calepins interactifs électroniques) en langage Python pour l'analyse de bioimages, en particulier pour l'apprentissage automatique.



3. Illustration de diverses expériences de *tracking*. A. Exemple de deux images d'une séquence de 500 images montrant le déplacement de nanoparticules. La MIP montre toutes les trajectoires par une projection à intensité maximum le long du temps. Le rendu 3D des trajectoires est obtenu en considérant le temps comme la troisième dimension. B. Suivi d'un télomère (extrémité des chromosomes) dans un noyau cellulaire. La membrane cellulaire et le télomère sont marqués par un agent fluorescent, ici vert (GFP). La trajectoire est illustrée par un trait rouge sur une section (X, Y) et sur une section (X, T). Source d'images : Susan Gasser, Université de Genève et Daniel Sage, EPFL.

3 Le *tracking*

La quantification de la dynamique cellulaire est une des applications les plus courantes. Elle s'effectue soit par une analyse « pixel par pixel », soit, beaucoup plus souvent, au niveau des objets par le suivi individuel (ou *tracking*). En embryogenèse, par exemple, les lignées cellulaires sont reconstruites à partir du *tracking*, qui permet de remonter l'historique de division de chaque cellule (figure 3). En bio-imagerie, les cibles à traquer sont d'une grande diversité, allant du petit animal jusqu'au noyau cellulaire. En outre, la dynamique, les divisions, les densités, etc. sont autant de facteurs qui rendent difficile l'émergence d'un programme « à-tout-faire ».

Dans le modèle de *tracking* « image par image », les algorithmes exécutent d'abord une « segmentation par instance » dans chacune des images pour détecter les objets d'intérêt en se basant sur des indices visuels (couleur, morphologie) ou par des prédictions issues d'un modèle d'apprentissage profond*. Dans un second temps, les objets de deux images consécutives sont associés par ressemblance et par proximité. Cette approche présente deux défauts. Tout d'abord, une seule mauvaise détection (comme une cible en dehors du plan focal) peut entraîner une propagation d'erreurs. Ensuite, cette méthode « image par image » ne tire pas avantage de connaissances *a priori* du déplacement.

Il est donc nécessaire de mieux tirer profit de la nature spatio-temporelle des signaux pour rendre les algorithmes plus robustes. Par exemple, l'algorithme *U-track* cherche à associer les objets non-ambigus par des courts segments de trajectoires. Puis, de proche en proche, il constitue la trajectoire complète en remplissant éventuellement les absences. Les approches par graphes sont une autre option pour résoudre le problème globalement. Les cibles détectées forment les nœuds du graphe et chaque arc du graphe a une probabilité d'association. Sous cette forme, les informations du passé et du futur se renforcent mutuellement, ce qui permet de trouver le chemin optimal définissant les trajectoires.

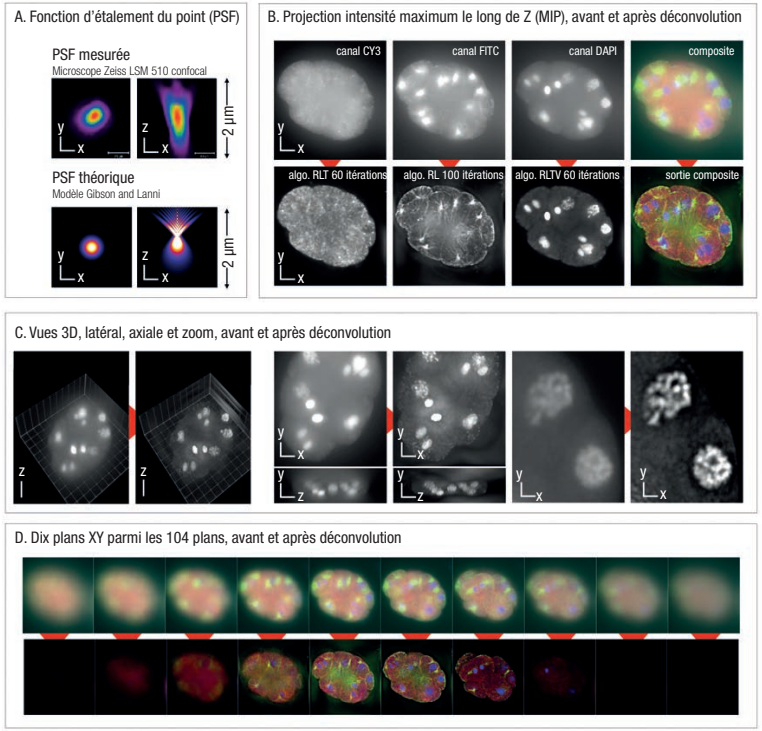
Cependant, avant de commencer les opérations de *tracking*, il est souvent nécessaire de restaurer les images multidimensionnelles en appliquant divers traitements afin de compenser les dégradations les plus courantes en microscopie : le bruit, le flou de défocalisation et la dérive spatiale. Sans ces procédés numériques, il serait impossible d'avoir des images exploitables.

4 Le débruitage et la déconvolution

À force de pousser l'instrumentation dans ses limites de résolution spatiale et temporelle, les signaux détectés sont devenus faibles en comparaison avec le bruit de fond. Ceci est exacerbé au cours des longues expériences de fluorescence, où le signal décroît inexorablement au fil du temps suite au photoblanchiment* des traceurs fluorescents. Il faut donc faire appel à des techniques numériques de débruitage pour s'affranchir du bruit. Ces fonctions de débruitage d'images 2D sont présentes dans tous les logiciels standards, mais bien peu savent tirer avantage de la nature multidimensionnelle. Le débruitage s'appuie généralement sur un filtrage sélectif qui tend à atténuer les hautes fréquences* du signal, là où réside l'essentiel du bruit. En plus, certaines méthodes intègrent aussi des *a priori* sur le signal pour protéger les objets d'intérêt d'un filtre trop destructeur, comme le filtre « médian » ou le filtre à variation totale. Ces filtrages peuvent être appliqués dans toutes les dimensions spatiales et temporelle. L'algorithme de débruitage par moyennes non locales (NLM) exploite quant à lui les auto-similarités d'une image, fréquentes en bio-imagerie, qui se présentent sous la forme de juxtaposition de blocs de pixels similaires. Très récemment, « noise2noise » a obtenu d'excellents résultats de débruitage en bio-imagerie. Cette méthode est basée sur un apprentissage profond* non supervisé qui s'appuie sur l'indépendance statistique du bruit d'un pixel au pixel voisin.

Outre le bruit, les images de microscope sont dégradées par la défocalisation qui engendre la présence de zones floues. La défocalisation est bien caractérisée par la « fonction d'étalement du point* » (PSF en anglais) qui est la réponse à une source de lumière ponctuelle, propre à chaque microscope. La PSF encode les déformations provoquées par la diffraction* de la lumière. Elle se présente sous la forme d'un double cône dans la direction axiale (Z), ce qui explique que les images sont de plus en plus floues quand on s'éloigne du plan focal. Sa connaissance complète permet de compenser numériquement la défocalisation avec des algorithmes de déconvolution.

La déconvolution tend à inverser la convolution avec la PSF qui se produit dans l'objectif du microscope, en réallouant au bon endroit les photons dispersés (figure 4). Elle procède par une optimisation numérique qui cherche à exploiter au mieux la PSF et les *a priori* pour le signal à reconstruire.



4. Déconvolution 3D en microscopie. A. Deux exemples de fonctionnement d'étalement du point (PSF) en 3D qui sont utilisées par les algorithmes de déconvolution, elles sont représentées ici en pseudo-couleur. B, C, D. Diverses vues d'un échantillon avant déconvolution et après déconvolution. Dans les coupes YZ on peut apprécier la diminution du flou de défocalisation. Résultat de déconvolution sur des données 3D à 3 canaux fluorescents (CY-3, FITC, DAPI) : chacun des canaux a été reconstruit avec un algorithme de déconvolution différent et avec une PSF adaptée pour la longueur d'onde. Les volumes d'images en Z ont été acquis sur un microscope à plein champ. L'échantillon est un embryon de *Caenorhabditis elegans*, on peut identifier les 8 premiers noyaux cellulaires en DAPI (bleu). Les résultats en couleurs sont une composition des 3 canaux fluorescents dans une image couleur en rouge, vert et bleu. Les PSF théoriques peuvent être calculées avec le plugin d'ImageJ, PSF Generator. Les algorithmes de déconvolution 3D sont accessibles avec le plugin d'ImageJ, DeconvolutionLab2. Source : Alessandra Griffa, Daniel Sage, Nathalie Garin, EPFL.

En 3D, ce procédé est très exigeant en termes de ressources de calcul (mémoire et processeurs). La déconvolution permet de débruiter les volumes rendant les images plus nettes et, surtout, elle élimine une grande partie du flou de focalisation. La résolution s'en trouve ainsi améliorée. La déconvolution montre comment l'ordinateur peut s'allier intelligemment au microscope pour restituer un signal dégradé (figure 4).

5 Le recalage

Lors des longues acquisitions, le support de l'échantillon n'est jamais complètement stable sous le microscope, ce qui fausse l'analyse du mouvement des particules biologiques. Les algorithmes de « recalage » peuvent corriger numériquement ces dérives.

Les algorithmes classiques de recalage détectent des points d'intérêt jugés intéressants pour l'analyse, comme des coins, des jonctions, etc. Ces points sont détectables en 2D ou en 3D, image après image, puis mis en correspondance entre deux images consécutives. Ces algorithmes de vision par ordinateur échouent cependant en bio-imagerie, car les structures vivantes ne présentent pas suffisamment de points d'intérêt très typés. Il est donc nécessaire d'appliquer un autre type d'algorithme plus coûteux en ressource machine, qui optimise un critère de ressemblance « pixel à pixel » entre deux images. En pratique, une stratégie multi-résolution est nécessaire pour accélérer cette méthode en temps de calcul, surtout en 3D.

6 La quête de la super-résolution

En 1873, Ernst Abbe établit la limite théorique de résolution en microscopie optique – entre 200 et 250 nanomètres – à partir des lois physiques de la diffraction* de la lumière. De nombreux phénotypes biologiques restent donc inobservables, car ils sont plus petits que cette limite de résolution. Pourtant, au début des années 2000, tout bascule avec la maîtrise de la

technique de l'activation des fluorophores, permettant de faire clignoter les molécules dans les images. Des nouvelles caméras ultrarapides peuvent enregistrer l'émission des millions de molécules, presque une à une, avec peu de recouvrements spatiaux. Les algorithmes d'imagerie peuvent facilement détecter ces points brillants et localisent leur centre avec une précision inférieure au pixel. Il suffit alors d'accumuler ces centres dans une immense carte pour obtenir une image « pointilliste » en super-résolution. Ces cartes dévoilent alors les structures sous-jacentes formées par des millions de molécules distribuées aléatoirement dans des milliers d'images. Grâce à la capacité de l'ordinateur de traiter des millions de données, il est possible de faire des rendus de structures cellulaires à une résolution 10 fois meilleure que la limite théorique. La précision peut aller jusqu'à 10 nanomètres en acquisition latérale et 30 nanomètres en acquisition axiale, révélant, par exemple, la structure hélicoïdale des axones* (fibres qui conduisent le signal électrique des neurones* jusqu'aux synapses*). Ainsi, grâce à l'alliance entre la microscopie, la biophysique, et la bio-imagerie computationnelle, on est parvenu à franchir la barrière de diffraction de la lumière (ce qui vaudra le prix Nobel de Chimie 2014 à E. Betzig, S. Hell et W. E. Moerner).

Mais comme souvent rien n'est complètement gratuit, pour espérer reconstruire une image de bonne qualité il faut des millions de points, nécessitant l'acquisition de dizaines de milliers d'images. Ce que l'on gagne en résolution spatiale est donc perdu en résolution temporelle.

7 Algorithme de localisation

Le choix de l'algorithme de localisation est essentiel pour obtenir une bonne super-résolution. En général, les algorithmes procèdent en quatre étapes : le débruitage ; la détection des régions d'intérêt ; la localisation ; et la correction des dérives (figure 5). La localisation est une étape critique, qui consiste à ajuster la fonction d'étalement du point* dans une petite région d'intérêt.

Les algorithmes de super-localisation fonctionnent bien seulement pour une faible densité de fluorophores par image (10 à 20), ce qui nécessite des

milliers d'images et des temps d'acquisition très longs. En augmentant la densité à plus de 100 émetteurs par image, on multiplie les risques de recouvrements des PSF. Tout le défi est de concevoir des algorithmes dits « multi-émetteurs » capables de localiser précisément quelques molécules dans une région d'intérêt de quelques pixels. De grands progrès ont été faits avec des méthodes d'optimisation discrète et les résultats obtenus sont remarquables.

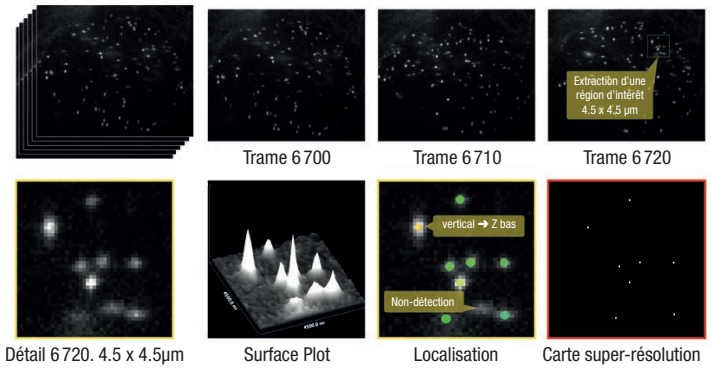
8 Et en 3D ?

En microscopie par super-localisation, la 3D (qui nécessite d'acquérir plusieurs plans focaux) n'est pas possible, car il faut tenir la cadence temporelle pour capter les clignotements rapides des émetteurs. Cependant, des chercheurs ont imaginé de modifier la forme de la PSF pour lui donner une empreinte caractéristique en fonction de l'axe Z. Pour cela, le plus simple est de placer une lentille cylindrique devant l'objectif : ainsi, en bas de l'axe Z, la PSF présente une forme allongée en horizontale, et en haut de l'axe Z, une forme allongée en verticale. Les algorithmes 3D doivent donc localiser la PSF en X et Y et déterminer les paramètres de forme pour estimer Z avec une courbe de calibrage. Ce défi supplémentaire a été relevé par de nombreuses équipes de recherche, qui ont obtenu des résultats avec une précision de l'ordre de 15 nanomètres en latéral et de 50 nanomètres en axial (figure 6).

9 Conclusion

Toutes ces méthodes et pratiques décrites ici montrent que l'ordinateur est indispensable pour restaurer les bioimages dans toutes les dimensions et pour atteindre des niveaux utiles de super-résolution (cf. p. 32). Les algorithmes augmentent les performances de la microscopie, qui devient aussi moins invasive.

Une autre facette de la bio-imagerie computationelle est la quantification automatique des images pour extraire des informations statistiquement pertinentes sur les phénotypes étudiés par les biologistes. Ainsi, l'automatisation de l'analyse d'images, comme toutes les disciplines liées à la science des données, a connu récemment un bouleversement avec l'utilisation des réseaux de neurones* supervisés par apprentissage-machine. C'est un changement de paradigme : la machine est alimentée non plus par des modèles et des lois physiques, mais par des données exemple, afin de construire des algorithmes. En bio-imagerie, l'apprentissage machine* « *deep learning** » connaît des succès retentissants, par exemple, pour la classification des mélanomes de cancer de la peau ou pour la caractérisation des tumeurs de tissus d'histopathologie. Le déploiement de tels systèmes reste encore difficile, car il repose sur la mise à disposition de très larges bases de données d'images, où chaque cellule doit être annotée ou

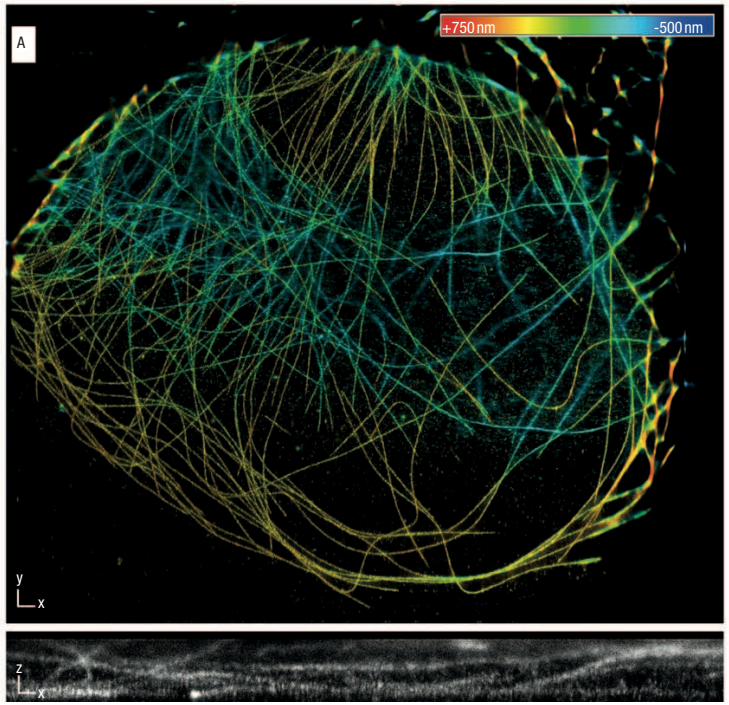


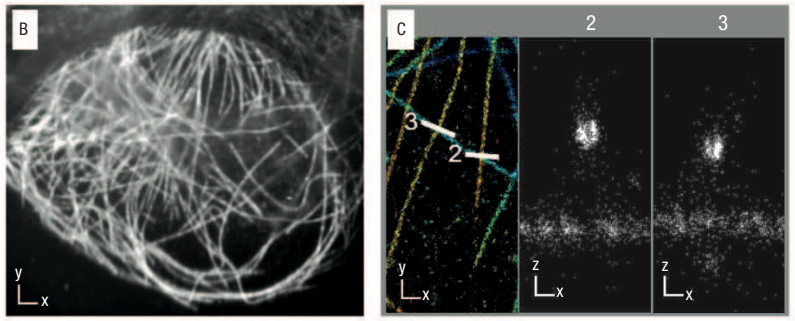
5. Principe de la microscopie par super-localisation. Un grand nombre d'images enregistrent l'émission des molécules clignotantes qui marquent la structure d'intérêt. En bas. Le détail de la trame 6 720 et le *Surface Plot* montrent les traces de la fonction d'étalement du point* (PSF) de 9 molécules émettrices. Dans cette expérience, une lentille cylindrique a été utilisée pour rendre la fonction d'étalement du point elliptique en fonction de la profondeur Z. Le logiciel doit alors localiser précisément la position de chaque molécule et analyser son ellipticité pour déterminer sa position axiale. Les positions des centres des molécules sont accumulées dans une carte qui deviendra l'image super-résolue. Source : Daniel Sage, EPFL

classifiée par un expert. En pratique, ces bases de données sont très rares dans les sciences du vivant. Par ailleurs, l'usage exclusif des données suscite des questionnements sur l'interprétation des prédictions.

La bio-imagerie computationelle doit trouver le nécessaire équilibre entre une approche *deep learning* entièrement guidée par des données exemples et une approche « ingénierie » construite avec une méthodologie interprétable et reproductible.

Faire progresser les connaissances dans le domaine de la santé passe par une meilleure compréhension de la fabuleuse machinerie de la cellule. La cellule réserve encore bien des secrets qui sont percés peu à peu par les biologistes largement équipés d'outils aux technologiques numériques très avancées. La bio-imagerie, par une savante combinaison de la microscopie et de l'informatique y contribue très largement comme nous l'avons vu au travers de quelques applications.





6. Reconstruction en microscopie par super-localisation. Cette illustration montre un réseau de microtubules d'une cellule de lignée cellulaire U2OS, marquée avec un fluorophore Alexa Fluor 647. Cette cellule a été imagée avec un système dSTORM sur une optique de microscope 160x/1.43-NA Leica équipée d'une lentille cylindrique pour accéder à la 3D, 112 683 images, champ de vue 37,9 x 34,4 µm. **À gauche.** A. Rendu complet de 8 575 582 localisations sur une image 1 334 x 1 210 pixels à raison de 30 nm/pixel. La couleur encode la position en Z. Les localisations ont été calculées avec le logiciel CSpline qui modélise précisément la fonction d'étalement du point* avec un ensemble de fonctions spline. Une correction de dérives, une correction de non-axialité et un regroupement temporel ont été appliqués. **À droite.** B. Image obtenue par un microscope conventionnel. C. Détail et deux vues en coupe de microtubules de 25 nm de diamètre. Source : Jonas Ries, EMBL et Daniel Sage, EPFL.