

# Analyse de la déformation cellulaire en 3D par ondelettes sphériques

Christel DUCROZ, Jean-Christophe OLIVO-MARIN, Alexandre DUFOUR

Institut Pasteur, Unité d'Analyse d'Images Quantitative  
25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

`cducroz@pasteur.fr`, `jcolivo@pasteur.fr`, `adufour@pasteur.fr`

**Résumé** – Le but de ce travail est de détecter de manière fiable et automatique les protubérances apparaissant et disparaissant de la surface de cellules se déplaçant selon un mode amoéboïde ou assimilé (e.g. certains parasites, cellules immunitaires et cellules métastatiques). Les cellules sont observées en vidéo-microscopie à fluorescence 3D et leur surface extraite par segmentation sous forme de maillages triangulaires. Nous proposons d'utiliser la transformée en ondelettes sphériques pour détecter ces protubérances apparaissant à la surface de cellules en déformation, et ce de façon robuste et indépendante de la taille des cellules. La méthode proposée permet par ailleurs un suivi des protubérances au cours du temps, permettant de quantifier de nouveaux facteurs du mouvement cellulaire de type amoéboïde.

**Abstract** – The aim of this work is to detect in a reliable and automatic way the protrusions appearing and disappearing from the surface of cells undergoing amoeboid motion (e.g. certain parasites, immune and metastatic cells). Cells were observed by 3D time-lapse fluorescence microscopy and their surface extracted by segmentation in the form of triangular mesh surfaces. Here we propose to use the spherical wavelet transform to detect protrusions that appear on the surface of deforming cells robustly and independently of the cell size. The proposed tool also allows monitoring of protrusions over time, to quantify new factors such amoeboid cell movement.

## 1 Introduction

La plasticité et la déformation cellulaire sont deux facteurs complexes et essentiels à de nombreux processus biologiques, notamment durant le développement tissulaire, la dissémination du cancer par métastases ainsi que durant certains processus infectieux [1, 2]. Nous nous intéressons ici plus particulièrement au mouvement de type amoéboïde, adopté par certains lymphocytes durant la réponse immunitaire ou encore par certains parasites comme *Entamoeba histolytica* (responsable de l'amibiase) durant l'invasion de l'hôte. Il est caractérisé par la formation de protubérances à la surface de la cellule pouvant soit se rétracter (phénomène appelé “blebbing”), soit adhérer au milieu environnant pour déclencher le mouvement de la cellule [3].

Pour étudier ces mécanismes, des parasites sont observés au microscope à fluorescence 3D, produisant des séquences temporelles de cellules en déformation amoéboïde (cf. Figure 1). Le but de ce travail est de pouvoir détecter automatiquement la formation de protubérances à la surface des cellules par analyse morphologique 3D, dans le but de mieux comprendre le processus de déformation sous-jacent.

En raison de la variabilité naturelle de la forme cellulaire au sein d'une population pourtant homogène, les descripteurs de formes classiques, utilisant généralement une représentation voxélique de la forme d'intérêt s'avèrent limités car trop sensibles à de petites variations de forme. Des descripteurs plus complexes basés sur une analyse fréquentielle de la forme sont mieux adaptés dans ces situations, car ils permettent de distinguer les variations de formes à différentes échelles et donc de

négliger les variations considérées comme du bruit. C'est le cas par exemple des harmoniques sphériques, où chaque forme est considérée comme un signal sphérique et projetée sur une base de fonctions polynomiales isolant les différentes fréquences du signal initial et donc les différents types de forme associés [4, 5, 6, 7]. Néanmoins, par analogie avec la transformée de Fourier, cette méthode reste globale et ne permet pas de les localiser aisément sur la surface. Pour remédier au problème de localisation, d'autres approches telles que les ondelettes sphériques [8, 9] ont été développées dans des domaines aussi divers que l'indexation [10], l'analyse de textures [11] et l'analyse de forme, notamment en imagerie médicale [12, 13]. Les ondelettes sphériques sont considérées comme une sous-famille d'ondelettes dites “généralisées”, en ce sens qu'elles étendent les ondelettes classiques (construites sur grilles diadiques) aux espaces irréguliers et non uniformes de  $\mathbb{R}^n$ , tout en apportant une base adaptée à l'analyse de courbes et de surfaces. Plus complexes à construire et à manipuler, ces ondelettes ne sont plus obtenues par simples dilatations-translations d'une ondelette “mère”, les coefficients de filtres dépendent donc de la position et de l'échelle (en raison de limitation de place, nous renvoyons le lecteur intéressé à [8] et [14] pour plus de détails sur la construction de ces ondelettes).

Dans ce travail, nous proposons d'appliquer pour la première fois les ondelettes sphériques à l'analyse de la morphologie cellulaire, afin de détecter les protubérances à la surface de manière précise et indépendante de la taille des cellules.

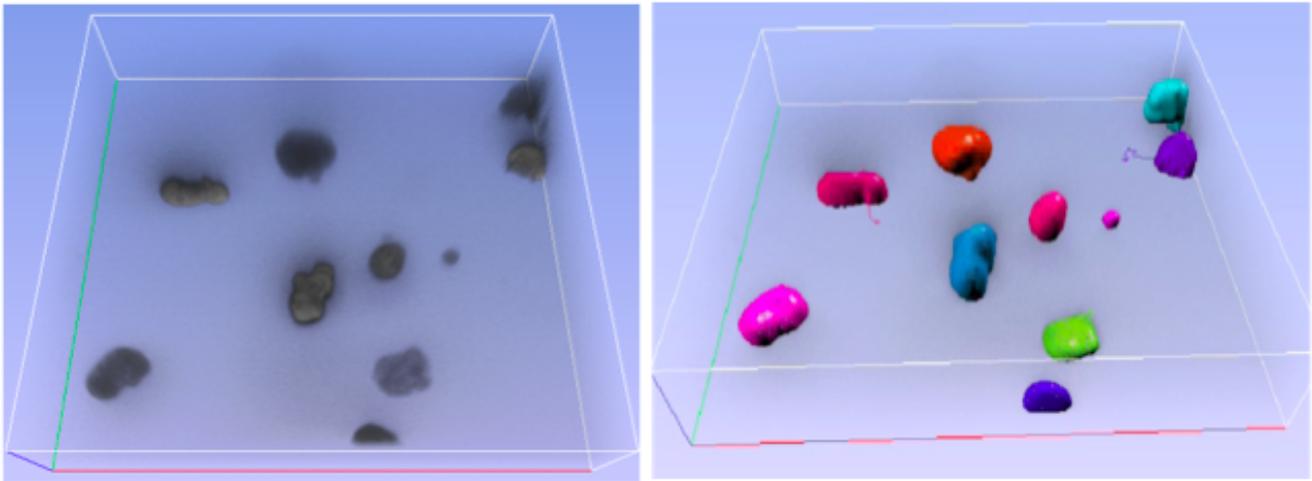


FIGURE 1 – Parasites *Entamoeba histolytica* observées dans un environnement 3D par microscopie confocale à fluorescence. À gauche : rendu 3D des données brutes. À droite : rendu 3D des cellules extraites par la méthode des maillages actifs.

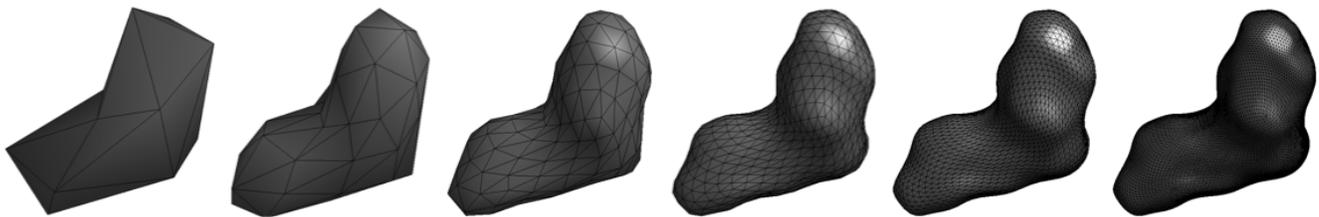


FIGURE 2 – Décomposition multi-échelle d’une surface cellulaire utilisée pour la détection de protubérances (représentée ici dans l’espace objet plutôt que sur la sphère). L’échelle la plus grossière (à gauche) est un maillage de 12 sommets (analogue à un icosaèdre, puis chaque échelle suivante est obtenue en subdivisant chaque triangle en quatre.

## 2 Approche proposée

La transformée en ondelettes sphériques suppose que le signal d’intérêt est défini sur la sphère. Ici, nous supposons que la surface de chaque cellule a été préliminairement extraite (nous utilisons ici la méthode des maillages actifs, développée précédemment dans notre laboratoire [15]), puis projetée sur la sphère pour obtenir trois signaux sphériques  $f_x$ ,  $f_y$  et  $f_z$  (cf. [7] pour plus de détails). Chaque signal sphérique est ensuite échantillonné sur un maillage sphérique régulier de 10242 sommets, nombre correspondant à la cinquième tessellation de l’icosaèdre régulier. De ce fait, nous disposons de six niveaux de représentation du signal original (cf. Figure 2). Par la suite, nous considérons un descripteur invariant par rotation en calculant la norme  $L_2$  des coefficients selon chaque direction.

### 2.1 Détection de blebs : validation qualitative

Les protubérances sont caractérisées par des portions de surface dont la courbure augmente par rapport au voisinage immédiat. Ces variations locales de courbure peuvent être capturées dans le domaine des ondelettes, en détectant les variations lo-

cales de coefficients d’une échelle à l’autre. Ceci est illustré sur la figure 3, où les coefficients ont été seuillés manuellement sur certaines échelles sélectionnées empiriquement pour faire ressortir les sommets concernés (illustrés en rose).

### 2.2 Détection de blebs : approche automatique

Afin d’automatiser la sélection des échelles ainsi que les seuils de détection, nous proposons une méthode dépendante uniquement de la taille  $\alpha$  des structures d’intérêts. Dans le cas présent, le diamètre d’une protubérance mesure environ dix microns en moyenne [3]. Les cellules n’ayant pas toute la même taille, il vient qu’une protubérance n’apparaîtra pas toujours sur la même échelle d’une cellule à une autre. Ainsi, nous mesurons d’abord la résolution de chaque cellule au niveau le plus grossier (i.e. la distance moyenne entre deux sommets voisins du maillage de niveau 1) et définissons un seuil générique égal à  $\alpha/2$  (soit cinq microns ici). De cette manière, pour les cellules dont la résolution au niveau 1 est inférieure à  $\alpha/2$  (i.e. petites cellules), les protubérances seront détectables entre les échelles 2 et 3, alors qu’au delà (grosses cellules), les protubérances seront détectables entre les échelles 3 et 4. Une fois les échelles d’intérêt définies pour chaque cellule, les protubérances sont

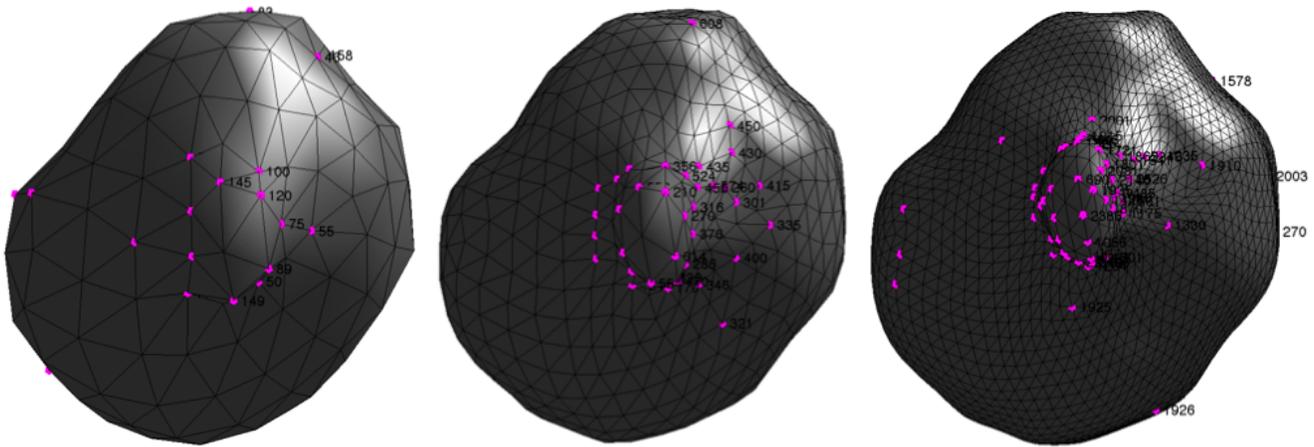


FIGURE 3 – Détection de protubérances par seuillage manuel dans le domaine ondelettes sur les échelles 4, 5 et 6 (de gauche à droite). Les sommets sélectionnés (en rose) indiquent une variation importante de courbure entre deux échelles consécutives et donc la présence d’une protubérance.

détectées dans le domaine ondelettes à l’aide d’un seuillage automatique à trois classes par la méthode d’Otsu [16]. Seule la troisième classe est considérée, ce qui permet de détecter les sommets avec les plus fortes courbures, tout en s’assurant qu’une cellule sans protubérance n’induit pas de fausses détections. Le nombre total et la forme de chaque protubérance est ensuite obtenue par recherche de composantes connexes sur les sommets détectés. La procédure finale de détection automatique de blebs peut être résumée par le pseudo-code suivant :

```

Données: Surface cellulaire (maillage)
Entrées: Coefficients d’ondelettes par sommets
Résultat: Liste de blebs détectés
Choisir les échelles en fonction du volume cellulaire
Seuiller les coefficients de l’échelle basse
Seuiller les coefficients de l’échelle haute
pour chaque point  $p$  détecté à l’échelle haute faire
  si  $p$  à un voisin détecté à l’échelle basse alors
    si un bleb existe au voisinage de  $p$  alors
      ajouter  $p$  au bleb existant
    sinon
      créer un nouveau bleb avec  $p$ 
      incrémenter le nombre de blebs détectés
    fin
  fin
fin

```

### 2.3 Suivi blebs dans des séquences vidéo

Une fois la détection de blebs établie, l’approche proposée est immédiatement applicable au suivi de blebs dans des séquences de vidéo-microscopie. En effet, le processus de formation des blebs est très dynamique, aussi l’étude temporelle de la mise en place des blebs est d’un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes de migration et d’interactions

entre cellules et environnement. La figure 4 illustre un exemple de suivi de blebs dans laquelle nous avons appliqué la méthode automatique de détection de blebs proposée plus haut sur chaque image d’une séquence 3D. Le suivi temporel est ensuite réalisé par à l’aide d’une association de type “plus proche voisin” entre les positions détectées des blebs au fil de la séquence. La robustesse du procédé de détection indique que cette approche permet de détecter et de suivre un ou plusieurs blebs de manière fiable au cours du temps, permettant ainsi de détecter et mesurer le temps de vie d’un bleb, depuis sa protrusion initiale à la surface de la cellule jusque sa disparition, soit par rétraction, soit par adhésion et mouvement de l’amibe dans sa direction. Ces résultats préliminaires sont encourageants et seront améliorés par la suite afin de gérer les cas plus complexes, notamment lorsque le nombre et la forme des blebs varient au cours du temps, ou encore lorsque plusieurs blebs fusionnent à la surface de la cellule.

## 3 Conclusion & perspectives

Le travail proposé est une application nouvelle des ondelettes sphériques à l’analyse morphologique de cellules en déformation. La méthode développée permet d’extraire des structures d’intérêt (ici des protubérances) et de les suivre au cours du temps sur la surface cellulaire, dans le but d’améliorer notre compréhension des mécanismes de déformation et de migration. Outre l’amélioration de la méthode de quantification et le suivi de structures, l’étape suivante consiste à mettre en rapport la position des protubérances et la trajectoire cellulaire afin de comprendre l’influence de l’environnement sur le mode de migration.

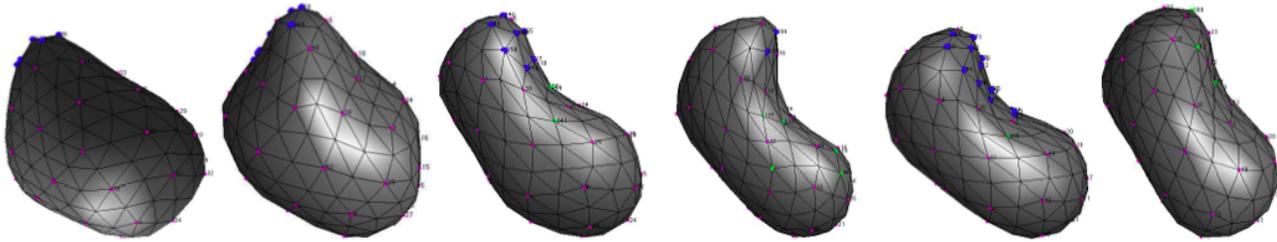


FIGURE 4 – Suivi d’une protubérance cellulaire au cours du temps. Les sommets bleus indiquent la détection d’une protubérance et son suivi durant cinq points de temps successifs (de gauche à droite) jusqu’à sa rétractation vers le corps cellulaire au sixième point de temps, soit une durée de vie d’environ 2 minutes.

## Références

- [1] R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, and C.S. Chen, “Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment”, *Develop. Cell*, vol. 6, no. 4, 2004, pp. 483-495.
- [2] R. Ananthkrishnan, and A. Ehrlicher, “The forces behind cell movement”, *Int. J Biol Sci.*, vol. 3, no. 5, 2007, pp. 303-317.
- [3] B. Maugis, J.Brugues, P. Nassoy, N. Guillen, P. Sens and F. Amblard, “Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility”, *Journal of Cell Science*, no. 123, 2010, pp. 3884-3892.
- [4] D.W. Ritchie, and G.J.L. Kemp, “Fast Computation, Rotation and Comparison of Low Resolution Spherical Harmonic Molecular Surfaces”, *J. Comp. Chemistry*, vol. 20, no. 4, 1999, pp. 383-395.
- [5] L. Shen, and F. Makedon, “Spherical mapping for processing of 3D closed surfaces”, *Image and Vision Computing*, vol. 24, no. 7, 2006, pp. 743-761.
- [6] K. Khairy, J. Foo, and J. Howard, “Shapes of Red Blood Cells : Comparison of 3D Confocal Images with the Bilayer-couple Model”, *Cell. and Mol. Bioeng.*, vol. 1, 2008, pp. 173-181.
- [7] C. Ducroz, J.-C. Olivo-Marin and A. Dufour, “Characterization of cell shape and deformation in 3D using Spherical Harmonics”, in *Proceedings of ISBI*, 2012, pp. 848-851.
- [8] P. Schröder and W.Sweldens, “Spherical Wavelets : Efficiently Representing Functions on the sphere.”, *Proceedings of SIGGRAPH 95*, 1995, pp. 161-172.
- [9] C. Lessig and E.Fiume, “SOHO : Orthogonal and Symmetric Haar Wavelets on The Sphere”, *ACM Transactions on Graphics*, Vol. 27, No. 1, 2008.
- [10] H. Laga, H.Takahashi, M. Nakajima, “Spherical wavelet descriptors for content based 3D model retrieval”, *Proceedings of IEEE SMI’06*, 2006, pp. 15.
- [11] P. Schröder and W.Sweldens, “Spherical Wavelets : Texture Processing.”, in *Rendering Techniques ’95*, 1995, p. 252-263.
- [12] P. Yu, P. E. Grant, Y. Qi, X. Han, F. Ségonne, R. Pienaar, E. Busa, J. Pacheco, N. Makris, R.L. Buckner, P. Golland and B. Fischl, “Cortical Surface Shape Analysis Based on Spherical Wavelets”, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 26, No. 4, 2007, pp. 582-597.
- [13] D. Nain, S. Haker, A. Bobick and A. Tannenbaum, “Multiscale 3-D shape representation and segmentation using spherical wavelets”, *IEEE Trans. on Medical Imaging*, vol. 26, No. 4, 2007, pp. 598-618.
- [14] Wim Sweldens, “The Lifting Scheme : A construction of second generation wavelets”, *SIAM Journal on Mathematical Analysis*, 1998.
- [15] A. Dufour, R. Thibeaux, E. Labruyère, N. Guillén, and J.-C. Olivo-Marin, “3D Active Meshes : fast discrete deformable models for cell tracking in 3D time-lapse microscopy”, *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 20, no. 7, 2011, pp. 1925-1937.
- [16] N. Otsu, “A threshold selection method from gray-level histograms”, *IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics*, vol. 9, no. 1, 1979.