

Détection de protrusions cellulaires en vidéo-microscopie 3D par ondelettes sphériques redondantes

Alexandre DUFOUR*, Robin TOURNEMENNE, Nancy GUILLEN, Jean-Christophe OLIVO-MARIN

Institut Pasteur Paris, Unité d'Analyse d'Images Biologiques
CNRS, URA 2582 - Interaction et Dynamique Cellulaires
25-28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France
adufour@pasteur.fr, jcolivo@pasteur.fr

Résumé – En biologie, la motilité cellulaire dite « amoéboïde » est caractérisée par l'émission de protrusions à la surface de la cellule, encore appelées « blebs ». La coordination de ses protrusions et leurs liens avec la motilité étant encore mal établis, il convient de pouvoir quantifier et localiser ces protrusions de manière robuste à partir d'observation en vidéo-microscopie 3D. Nous proposons ici une approche automatisée pour la détection automatique de ces « blebs » basée sur le formalisme des ondelettes sphériques redondantes. Ce formalisme est analogue aux ondelettes traditionnelles, ce qui simplifie grandement leur manipulation par rapport aux ondelettes généralisées. Nous présentons ici des résultats préliminaires encourageant obtenus sur notre organisme modèle, le parasite humain *Entamoeba histolytica*.

Abstract – In biology, so-called “amoeboid” cell motility is characterised by the emission of protrusions at the cell surface, also known as “blebs”. Their coordination and link to cell motility is still poorly understood, raising the need for computational methods able to reliably quantify and localise these protrusions from observations obtained by 3D time-lapse microscopy. We propose here an automated approach to detect these “blebs” using over-complete spherical wavelets. This framework is analogous to traditional wavelets, which simplifies their manipulation in comparison to generalised wavelets. We present here encouraging preliminary results obtained on our model organism, the human parasite *Entamoeba histolytica*.

1 Introduction

La déformation et la motilité cellulaire sont des processus dynamiques, régis par une machinerie complexe, et sont directement impliqués dans de nombreux processus clés en biologie, notamment lors du développement, lors des réponses immunitaires, ou encore lors de processus invasifs [1, 2]. Parmi les différents modes de migration adoptés par cellules mobiles, le mouvement amoéboïde est particulièrement intéressant car typique chez certains parasites lors de l'infection, ainsi que chez les cellules cancéreuses métastatiques. Ce mouvement est caractérisé par la formation de protubérances à la surface de la cellule (cf. fig. 1), qui dans certains cas adhèrent au substrat et induisent le mouvement de la cellule entière [3]. Une technique efficace permettant d'étudier ce mécanisme est la microscopie à fluorescence, où les cellules vivantes peuvent être observées sur des périodes de temps prolongées en 3D de manière peu ou non-invasive. Dans le but de comprendre les liens entre protrusions et motilité cellulaire, une étape importante consiste à quantifier ces blebs afin d'en extraire leur nombre et position au cours du temps. Dans ce travail, nous nous intéressons à l'extraction de ces protubérances à la surface cellulaire en proposant une méthode automatique d'analyse de la morphologie cellulaire 3D.

La représentation et l'analyse de formes 3D en biologie a connu un essor considérable lors des dernières décennies, notamment depuis l'avènement des techniques modernes d'acqui-

sition et de modélisation 3D, permettant d'étudier la biologie à toutes les échelles spatiales, de la molécule unique [4] aux cellules [5, 6] jusqu'aux organes entiers [7, 8]. Néanmoins, du fait de la variabilité naturelle des morphologies observées dans des populations pourtant considérées homogènes, les descripteurs de forme classiques (mesurant le volume, l'élongation, la sphéricité, etc.) donnent souvent des mesures trop générales et peu spécifiques, tandis que les descripteurs morphologiques locaux (squelette morphologique, courbure locale, etc.) sont très sensibles au bruit expérimental de mesure ainsi qu'à la variabilité des populations observées. Une alternative de choix à ces techniques réside sur la sphère, où de nombreuses techniques robustes de traitement du signal ont été développées, en particulier dans le cadre du traitement multi-échelles, venant notamment de domaines où des données expérimentales sont naturellement sphériques [9, 10]. Dans ce contexte, deux grandes familles de méthodes se distinguent : les harmoniques sphériques d'une part, et les ondelettes sphériques d'autre part. Dans les deux cas, la surface de la forme d'intérêt est d'abord projetée sur la sphère afin d'en obtenir une représentation sphérique [8]. Lors de l'analyse en harmoniques sphériques (ci-après « SPHARM »), le signal sphérique obtenu est ensuite projeté sur une base de fonctions à support global (de manière analogue à l'analyse de Fourier), permettant une analyse riche et robuste de sa conformation globale [4, 5, 6]. Dans le cas des ondelettes sphériques, le signal est projeté sur une base de

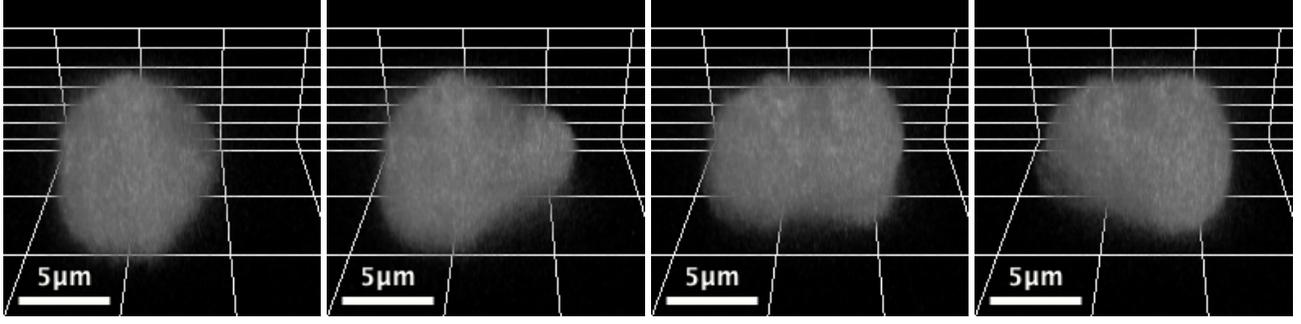


FIGURE 1 – Instantanés d’une séquence de vidéo-microscopie à fluorescence 3D présentant une cellule en déformation. De gauche à droite : avant protrusion (T=0) ; émission d’un bleb (T=0.2s) ; migration du corps cellulaire (T=0.4s) ; retraction de la partie postérieure (T=0.6s). Rendus 3D en lancé de rayons obtenus avec le logiciel Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org>).

fonction à support local, permettant une analyse plus spécifique des caractéristiques locales de la surface et, en particulier, d’extraire des structures tels que les protrusions cellulaires [11, 12].

Les ondelettes sphériques se dérivent elles-mêmes en deux sous-groupes, selon la façon dont elles sont construites. Le premier sous-groupe rassemble les ondelettes dites « généralisées » ou encore de « seconde génération », s’appuyant sur un cadre non-paramétrique émanant de la théorie des graphes, où les ondelettes sont construites à partir d’un maillage arbitraire (non nécessairement sphérique) par opérations successives d’élévation ou « lifting » [9, 13, 14, 12]. Le second sous-groupe repose sur une formulation de l’analyse en ondelettes grâce à la théorie des groupes et étend le cadre classique des ondelettes redondantes au domaine sphérique S^2 , facilitant grandement la réutilisation des opérations traditionnelles utilisées dans le plan [15, 16]. Grâce à sa forte analogie avec ondelettes classiques, le cadre est plus souple et permet la conception de filtres avec des propriétés personnalisées, telles que l’orientabilité [17] et l’auto-inversibilité [18].

Dans nos précédents travaux, nous employions les ondelettes sphériques généralisées afin de détecter les protrusions cellulaires [12]. Ici nous proposons d’exploiter les ondelettes sphériques redondantes en lieu et place de l’approche par graphe, afin de simplifier leur manipulation et ainsi permettre un choix plus flexible de types d’ondelettes adéquates et de techniques de seuil associées. Nous illustrons l’application de ce nouveau cadre méthodologique en présentant des résultats encourageant de détection de protrusions à la surface de cellules en mouvement, ici le parasite *Entamoeba histolytica*, responsable de l’amibiase humaine.

2 Méthode

Nous commençons cette section par un rappel théorique sur les ondelettes sphériques redondantes, puis décrivons leur application à la détection de protrusions cellulaires.

2.1 Rappel : ondelettes sphériques redondantes

Defintion Soit $x(\theta, \varphi) \in L^2(S^2)$ un signal sphérique paramétrisant la surface d’intérêt, avec $\theta \in [0, \pi]$ et $\varphi \in [0, 2\pi]$. Traditionnellement, les coefficients d’ondelettes y s’obtiennent par le produit interne entre le signal d’intérêt et l’ondelette à l’échelle et la translation considérée. Sur S^2 , la translation est remplacée par une rotation autour des trois angles d’Euler α , β and γ , où $\alpha \in [0, 2\pi]$ indique la rotation autour de l’axe X, $\beta \in [0, \pi]$ autour de l’axe Y et $\gamma \in [0, 2\pi]$ autour de l’axe Z. D’après cette notation, la convolution d’un signal sphérique x avec un filtre \tilde{h} s’écrit :

$$y_n(\gamma, \beta, \alpha) = \int_{S^2} \tilde{h}_{n,\gamma,\beta,\alpha}^*(\theta, \varphi) x(\theta, \varphi) d\Omega \quad (1)$$

où $\tilde{h}_{n,\gamma,\beta,\alpha}$ est le filtre d’analyse angle-dépendant à l’échelle n , $*$ dénote le conjugué complexe et $d\Omega = \sin \theta d\theta d\varphi$. Étant donné que \tilde{h} dépend de l’angle de rotation, il existe une infinité de filtres possibles. Afin d’éviter le calcul du filtre pour chaque orientation, nous nous plaçons dans le domaine des harmoniques sphériques, où une relation directe existe entre les coefficients d’harmoniques sphériques d’un filtre \tilde{h} et ceux de ses versions orientées, par le biais de la matrice de Wigner :

$$\tilde{h}_{n,\gamma,\beta,\alpha}^{l,m} = \mathcal{D}_{\gamma,\beta,\alpha}^{l,m}(\tilde{h}_n), \quad \text{t.q.} \quad (2)$$

$$\mathcal{D}_{\gamma,\beta,\alpha}^{l,m}(\tilde{h}_n) = \sum_{m'=-l}^l D_{mm'}^l(\gamma, \beta, \alpha) \tilde{h}_n^{l,m'} \quad (3)$$

où l et m sont respectivement les degrés et ordres de la décomposition en harmoniques sphériques et les $D_{mm'}^l$ sont les éléments de la matrice de Wigner, représentant l’ensemble unitaire des rotations admises dans $SO(3)$ pondéré par l . Ainsi, la valeur du filtre h pour n’importe quel angle (θ, φ) est aisément obtenue par la transformée en harmoniques sphériques inverse :

$$\tilde{h}_{n,\gamma,\beta,\alpha}(\theta, \varphi) = \mathcal{D}_{\gamma,\beta,\alpha}(\tilde{h}_n), \quad \text{t.q.} \quad (4)$$

$$\mathcal{D}_{\gamma,\beta,\alpha}(\tilde{h}_n) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \mathcal{D}_{\gamma,\beta,\alpha}^{l,m}(\tilde{h}_n) \cdot Y^{l,m}(\theta, \varphi) \quad (5)$$

Une banque unique de filtres non-orientés $\{\tilde{h}_n, h_n\}$ est donc suffisante pour définir de manière complète la transformée en

ondelette sphérique correspondante. Reprenant l'équation 1, les coefficients en ondelettes sont désormais calculables ainsi :

$$y_n(\gamma, \beta, \alpha) = \int_{S_2} [\mathcal{D}_{\gamma, \beta, \alpha}(\tilde{h}_n)]^*(\theta, \varphi) x(\theta, \varphi) d\Omega, \quad (6)$$

et la synthèse s'écrit de manière analogue :

$$\hat{x}(\theta, \varphi) = \sum_n \int_{SO(3)} [\mathcal{D}_{\gamma, \beta, \alpha}(h_n)](\theta, \varphi) y_n(\alpha, \beta, \gamma) d\rho \quad (7)$$

avec $d\rho = \sin \beta d\alpha d\beta d\gamma$.

Projection stéréographique et dilatation Le dernier composant restant à définir est la construction des ondelettes par dilatation dans le domaine sphérique. Suivant le travail présenté dans [15, 18], les ondelettes sphériques ϕ_{S^2} peuvent être aisément construites à partir leurs analogues planaires $\phi_{\mathbb{R}^2}$ à l'aide d'une projection stéréographique inverse :

$$\phi_{S^2}(\theta, \varphi) = \left(1 + \tan^2 \frac{\theta}{2}\right) \phi_{\mathbb{R}^2} \left(2 \tan \frac{\theta}{2}, \varphi\right) \quad (8)$$

De la même manière, il vient que les opérations de dilatation peuvent être effectuées dans le plan avant d'être projetées sur la sphère :

$$\phi_{S^2}(\theta, \varphi) = \left(\frac{1 + \tan^2 \frac{\theta}{2}}{1 + \left(\frac{1}{d} \tan \frac{\theta}{2}\right)^2}\right) \cdot \frac{\phi_{\mathbb{R}^2} \left(2 \tan^{-1} \left(\frac{1}{d} \tan \frac{\theta}{2}\right), \varphi\right)}{d} \quad (9)$$

où d est le facteur de dilatation.

2.2 Application aux protrusions cellulaires

Choix du filtre d'ondelettes Les protrusions cellulaires ayant une forme pseudo-isotrope, nous nous intéressons ici plus particulièrement aux filtres axi-symétriques. Ces filtres sont invariants par rotation autour de l'axe Z, impliquant que les coefficients d'ondelettes associés sont indépendants de γ , t.q. $\forall m \neq 0, \tilde{h}^{l,m} = 0$, ce qui simplifie considérablement leur calcul :

$$y(\beta, \alpha)^{l,m} = \sqrt{\frac{4\pi}{2l+1}} x^{l,m} \tilde{h}^{l,0*}, \quad (10)$$

Parmi les filtres disponibles, nous choisissons ici le Laplacien de Gaussienne (ou « LoG »), en raison de sa popularité dans la détection de structures similaires dans le plan 2D. Ce filtre est caractérisé par un paramètre unique σ exprimant l'écart-type du filtre Gaussien sous-jacent (cf. Fig. ??) :

$$\text{LoG}_\sigma(x) = -\frac{1}{\pi\sigma^4} \left[1 - \frac{x^2}{2\sigma^2}\right] e^{-x^2/2\sigma^2} \quad (11)$$

Seuillage des coefficients Une fois les coefficients d'ondelettes obtenus, nous appliquons ensuite un seuil universel suivant les travaux de Donoho et Johnstone [19] :

$$\lambda = \frac{\text{MAD}(y_n)}{0.6745} \sqrt{2 \log(p)} \quad (12)$$

où p est le nombre de coefficients à l'échelle n . Une fois seuillés, les structures d'intérêts sont isolés par analyse en composantes connexes.

3 Résultats

Validation Afin de valider la méthode, nous avons procédé à la simulation de données *in silico* représentant des cellules en protrusion (cf. Fig. 2). Chaque cellule est définie à l'aide d'une sphère centrale représentant le corps cellulaire, à laquelle est ajoutée un nombre aléatoire de protrusions (de deux à cinq), matérialisées à l'aide de gaussiennes non-isotropes simulant des protrusions de différentes tailles, en choisissant un écart-type aléatoire entre 0.25 et 0.4 dans chaque direction (bornes choisies empiriquement pour approcher au mieux les données réelles observées).

Une analyse systématique sur 100 cellules simulées nous donne un pourcentage de détection de protrusions de 98%, dénotant la robustesse de la méthode (NB : ce nombre ne tient pas compte de la surface de protrusion simulée, qui n'est pas définie dans la vérité-terrain). Une analyse qualitative révèle que les erreurs de détection sont dues à une trop grande proximité de certaines protrusions lors de la simulation et non à l'algorithme de détection.

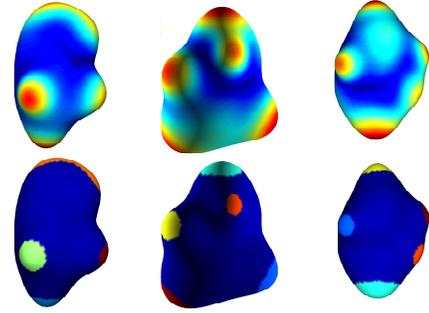


FIGURE 2 – Détection de protrusions sur données simulées. Haut : valeur des coefficients d'ondelettes projetées sur la surface. Bas : zones de protrusion détectées (pseudo-colorées).

Production et extraction des données Les cellules, préalablement marquées à l'aide d'un fluorophore non-spécifique, sont placées dans un gel 3D de collagen pendant 30 minutes. Elles sont ensuite observées pendant 15 minutes à intervalle régulier de 8 secondes sous un microscope confocal à disque de Nipkow avec objectif 25 \times , produisant ainsi des séquences de 120 points de temps, chaque temps comprenant un volume 3D de 30 microns d'épaisseur.

Après acquisition, les cellules sont automatiquement segmentées et suivies dans le temps à l'aide de notre technique rapide de maillage actifs publiée précédemment [20], produisant un maillage surfacique triangulaire à échantillonnage homogène (taille de maille : 1 micron) pour chaque cellule au cours du temps. L'échantillonnage est choisi petit par rapport à la taille des cellules observées (diamètre moyen : 15 microns).

Détection de protrusions La figure 3 illustrent des premiers résultats encourageant sur données réelles de cellules en déformation. Dans chaque cas, les zones extraites par la méthode

correspondent effectivement à une zone de protrusion. Il est important de noter que, bien qu'utilisant un filtre isotrope, les protrusions allongées peuvent toujours être détectées (cf. Fig. 3-a). Les résultats sur séquence temporelle (cf. Fig. 3-b) indiquent par ailleurs que la méthode proposée permet de développer des techniques de suivi temporel des protrusions, ouvrant la voie à des analyses plus avancées sur la dynamique de la déformation cellulaire.

Les résultats présentés ici ont été obtenus avec un filtre LoG d'écart-type $\sigma = 1$ et l'échelle 3. Alors que cette combinaison de paramètre est efficace dans la majorité des cas (simulés et expérimentaux), la sensibilité de la méthode pourrait néanmoins être améliorée, d'autant que certaines zones de protrusion sont parfois sous-estimées. Cette observation reste toutefois subjective, car validée au cas-par-cas par des expérimentateurs externes. La bonne concordance entre résultats sur données simulées et réelles est toutefois très encourageante.

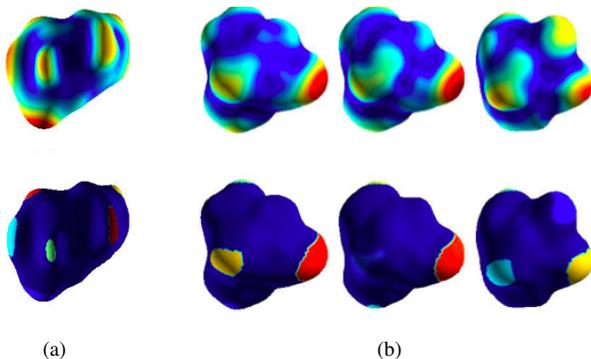


FIGURE 3 – Détection de protrusions sur données réelles. Haut : valeur des coefficients d'ondelettes projetées sur la surface. Bas : zones de protrusion détectées (pseudo-colorées). (a) Cellule statique avec protrusions allongées. (b) Séquence temporelle montrant une cellule en déformation et émettant une protrusion.

4 Conclusion

Nous avons présenté une nouvelle approche pour la détection de protrusions 3D à la surface de cellules en déformation, basée sur les ondelettes sphériques redondantes. Grâce à son formalisme analogue aux ondelettes planaires, l'outil proposé est facilement manipulable et plus intuitif par rapport à l'approche précédemment développée [12]. Cette flexibilité nous permettra par la suite d'explorer plus aisément différentes combinaisons de filtres, de choix d'échelles et de méthodes de seuils de coefficients, en s'appuyant aussi sur données simulées que sur données réelles.

D'un point de vue biologique, les résultats obtenus sont très encourageant et ouvrent la voie à une étude plus poussée des protrusions cellulaires et plus particulièrement leur lien avec les mécanismes de la déformation et de la motilité. Ces études permettront de compléter notre compréhension de la dynamique cellulaire interne que nous étions par ailleurs [21].

Références

- [1] R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, & C.S. Chen. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment, *Develop. Cell*, 6(4) :483-95, 2004.
- [2] R. Ananthakrishnan, & A. Ehrlicher. The forces behind cell movement, *Int. J. Biol. Sci.*, 3(5) :303-17, 2007.
- [3] B. Maugis, J.Brugues, P. Nassoy, N. Guillen, P. Sens & F. Amblard. Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility, *Journal of Cell Science*, 123 :3884-92, 2010.
- [4] D.W. Ritchie, & G.J.L. Kemp. Fast Computation, Rotation and Comparison of Low Resolution Spherical Harmonic Molecular Surfaces, *J. Comp. Chemistry*, 20(4) :383-95, 1999.
- [5] K. Khairy, J. Foo & J. Howard. Shapes of Red Blood Cells : Comparison of 3D Confocal Images with the Bilayer-couple Model, *Cell. and Mol. Bioeng.*, 1 :173-81, 2008.
- [6] C. Ducroz, J.-C. Olivo-Marin & A. Dufour. Characterization of cell shape and deformation in 3D using Spherical Harmonics, in *Proceedings of ISBI*, 848-51, 2012.
- [7] X. Zu, Y. Wang, T.F. Chan, P.M. Thonpson & S.T. Yau. Genus zero surface conformal mapping and its application to brain surface mapping, *IEEE Trans. Med. Imag.*, 23(8) :949-58, 2004.
- [8] P. Yu, P. E. Grant, Y. Qi, X. Han, F. Ségonne, R. Pienaar, E. Busa, J. Pacheco, N. Makris, R.L. Buckner, P. Golland & B. Fischl. Cortical Surface Shape Analysis Based on Spherical Wavelets, *IEEE Trans. Med. Imag.*, 26(4) :582-97, 2007.
- [9] P. Schröder & W. Sweldens, Spherical Wavelets : Efficiently Representing Functions on the sphere, in *Proceedings of SIGGRAPH 95*, 161-72, 1995.
- [10] R.D. van der Hilst, S. Widiyantoro & E.R. Engdahl, Evidence for deep mantle circulation from global tomography. *Nature*, 386 :578-84, 1997.
- [11] C.J. Du, J.G. Ferguson, P.T. Hawkins, L.R. Stephens & T. Bretschneider, Local Shape Representation in 3D : from Weighted Spherical Harmonics to Spherical Wavelet. *Proceedings of the British Machine Vision Conference*, pp. 122.1-122.12, 2012.
- [12] C. Ducroz, J.-C. Olivo-Marin & A. Dufour. Characterizing 3D cell shape changes using spherical wavelets. in *Proceedings of ICIP*, 2013, 3499-502.
- [13] W Sweldens. The Lifting Scheme : A construction of second generation wavelets, *SIAM Journal on Mathematical Analysis*, vol. 29, no. 2, 1997, pp. 511-46.
- [14] C. Lessig & E.Fiume. SOHO : Orthogonal and Symmetric Haar Wavelets on The Sphere, *ACM Trans. Graphics*, 27(1), 2008.
- [15] J-P Antoine & P Vanderghenst. Wavelets on the 2-Sphere : a Group-Theoretical Approach. *Appl. Comput. Harmon. Anal.*, 7 :262-91, 1999.
- [16] Y. Wiaux, L. Jacques & P. Vanderghenst. Correspondence principle between spherical and Euclidean wavelets. *The Astrophysical Journal*, 632 :820-32, 2005.
- [17] Y. Wiaux, L. Jacques, P. Vielva & P Vanderghenst. Fast directional correlation on the sphere with steerable filters, *The Astrophysical Journal*, 652(1) :820, 2006.
- [18] T. Yeo, W. Ou & P. Golland, On the construction of invertible filter banks on the 2-sphere. *IEEE Trans. Im. Proc.*, 17(3) :283-300, 2008.
- [19] D.L. Donoho & I.M. Johnstone. Adapting to Unknown Smoothness via Wavelet Shrinkage. *J. Am. Stat. Soc.*, 90(432) :1200-24, 1995.
- [20] A. Dufour, R. Thibeaux, E. Labrùye, N. Guillén & J.-C. Olivo-Marin. 3D Active Meshes : Fast Discrete Deformable Models for Cell Tracking in 3D Time-Lapse Microscopy. *IEEE Trans. Im. Proc.*, 20(7) :1925-37, 2011.
- [21] C. Simoncini, T. Lecomte, R. Thibeaux, N. Guillén, A. Dufour & J.-C. Olivo-Marin. A physical model and a simulation of the blebbing cell, *Proceedings of ISBI*, 2014.