

# Morphométrie de structures cellulaires biologiques partiellement observées par imagerie 3D

David Legland



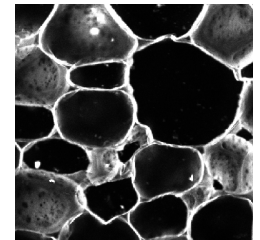
CEPIA-BIA

Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture

(Nantes)

# Contexte : caractérisation de produits alimentaires

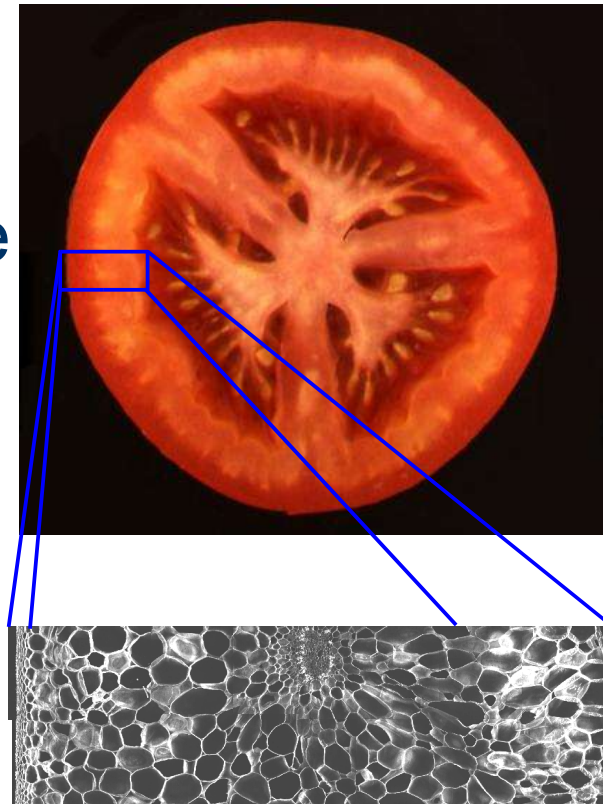
- Améliorer la qualité des produits alimentaires
- Produits modèles : pain, blé, tomate
- Pour la tomate :
  - Goût, odeur (composition chimique)
  - Texture sensorielle



➔ Quantifier la morphologie cellulaire

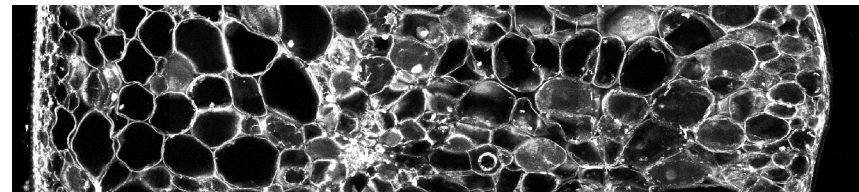
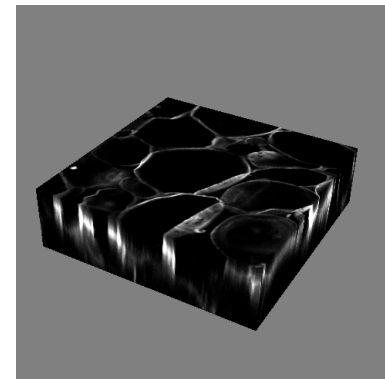
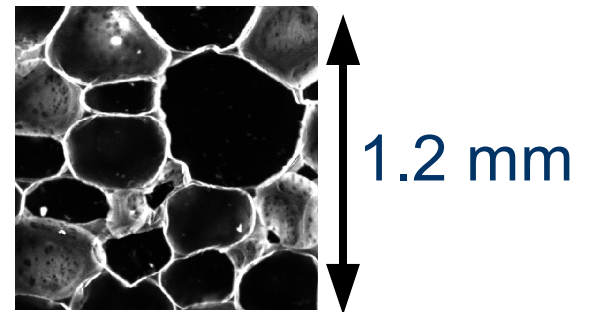
# Objectifs :

- Décrire la morphologie 3D globale du péricarpe
- Développer une chaîne complète
  - Échantillonnage, acquisition, traitement d'images, estimation, et analyse des résultats
- Développer des méthodes génériques
- Caractériser l'hétérogénéité spatiale



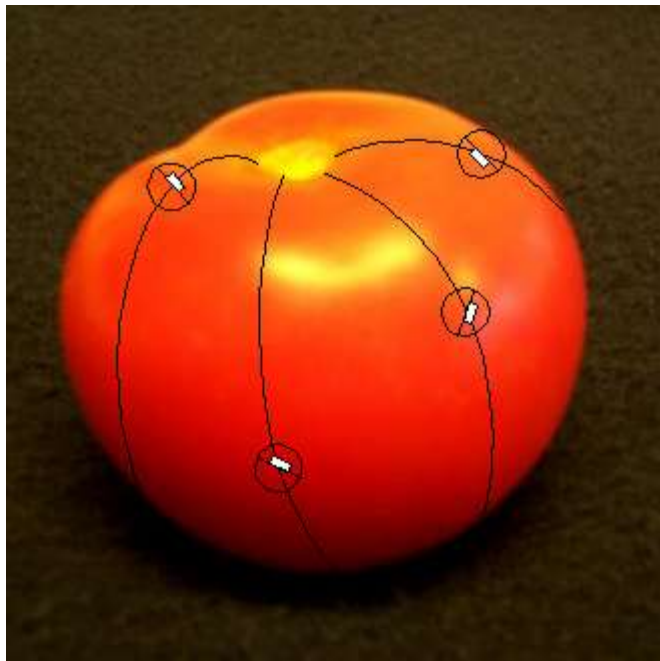
# Microscopie confocale à balayage laser

- Observation à l'échelle de la cellule
- Acquisitions en 3D
- Localisation en fonction de la profondeur



# Échantillonnage du matériau

Traversées de péricarpe perpendiculaires à la surface



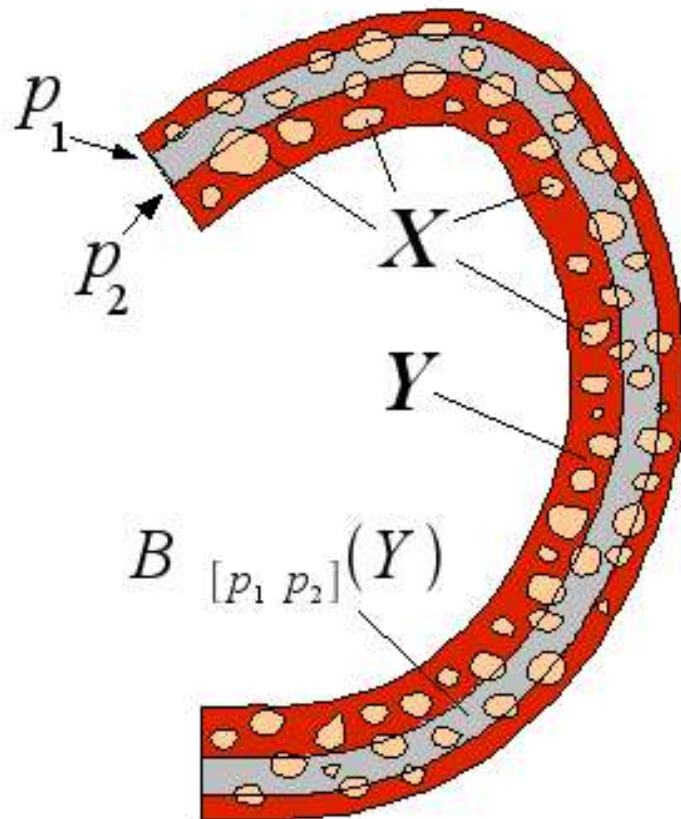
Nécessiter d'estimer les paramètres à partir des observations partielles

# Plan de l'exposé

- **Morphométrie des cellules du péricarpe**
  - Procédure d'estimation
  - Implémentation
  - Comparaison de lignées

# Ensembles à caractériser

Structure d'intérêt : les cellules du péricarde

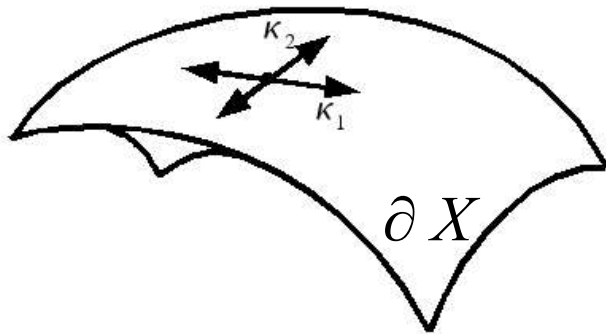


- Variabilité biologique modélisée par les ensembles aléatoires
- Pour les cellules  $X$
- Pour le péricarde  $Y$
- On a la relation :  $X \subset Y$
- Localisation par :

$$B_{[p_1 p_2]}(Y)$$

# Mesures morphométriques : fonctionnelles de Minkowski

Pour des ensembles déterministes :



$$V(X) = \int_X dx$$

$$S(X) = \int_{\partial X} dx$$

$$\bar{b}(X) = \frac{1}{2\pi} \int_{\partial X} m(x) dx$$

$$\chi(X) = \frac{1}{4\pi} \int_{\partial X} g(x) dx$$

Avec :

$$m(x) = \frac{\kappa_1(x) + \kappa_2(x)}{2}$$

$$g(x) = \kappa_1(x) \cdot \kappa_2(x)$$

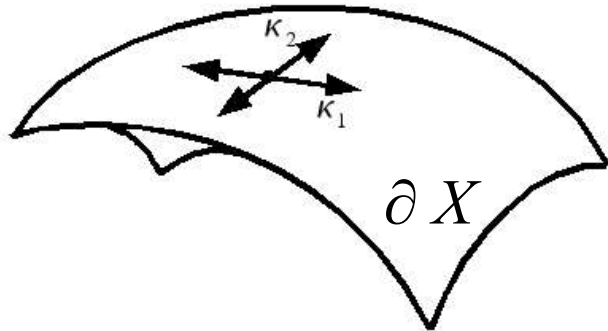
(courbure moyenne)

(courbure gaussienne)



# Mesures morphométriques : fonctionnelles de Minkowski

Les ensembles étant aléatoires, on utilise  
l'espérance des paramètres :



$$V = E V(\mathbf{X})$$

$$S = E S(\mathbf{X})$$

$$\bar{b} = E \bar{b}(\mathbf{X})$$

$$\chi = E \chi(\mathbf{X})$$

# Hétérogénéité spatiale

- Localisation pour un intervalle de profondeur :

$$S(p_1, p_2) = E S(\mathbf{X} \cap B_{[p_1, p_2]}(\mathbf{Y}))$$

- Forme ponctuelle :

$$S(p) \cdot dp = E S(\mathbf{X} \cap B_{[p, p+dp]}(\mathbf{Y}))$$

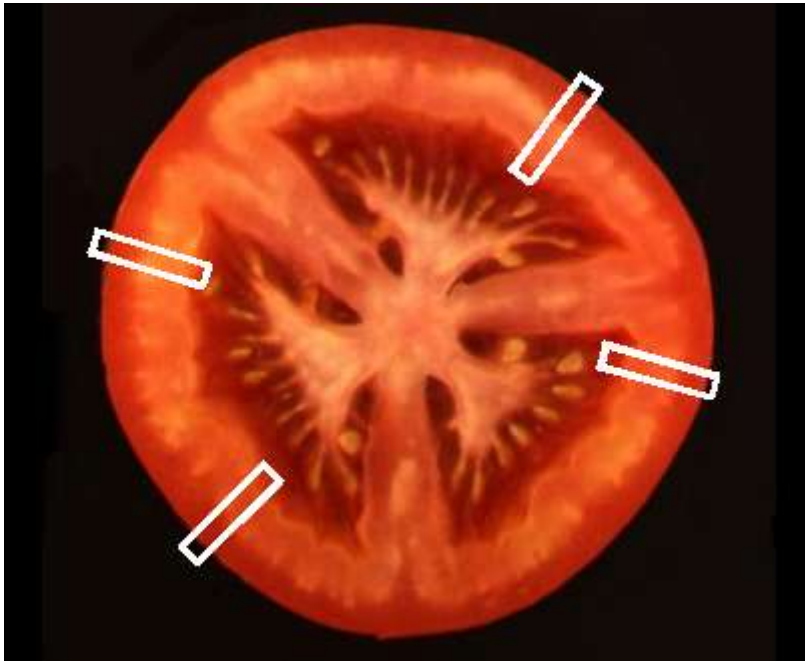
- Forme fonctionnelle :  $S(\varphi) = E \int_{\partial \mathbf{X}} \varphi(x) dx$   
→ nécessaire pour écrire l'estimateur

- Densité :  $S_V(\varphi)$  normalisée par le volume

# Plan de l'exposé

- Morphométrie des cellules du péricarpe
- **Procédure d'estimation**
- Implémentation
- Comparaison de lignées

# Le problème



On veut estimer :

- les paramètres globaux
- leurs densités

Structure plane ( $R=4\text{cm}$ ,  
 $\text{ép}=1\text{cm}$ , sonde  $1\text{mm}$ )

- Point 1 : à la surface  
(prof.=0)
- Point 2 : prof. = 1 cm

différence de probabilité  
d'échantillonnage égale à 30%

# Principe de Horvitz-Thompson

- Pondération de chaque contribution par l'inverse de sa probabilité d'échantillonnage

$$S = \int_{\partial_X} dx \quad \text{est estimé par : } \hat{S} = \int_{\partial_{X \cap T}} P[x \in T | Y]^{-1} dx$$

→ Estimateur sans biais

Horvitz et Thompson (1952), Miles (1974), Jensen (1998)

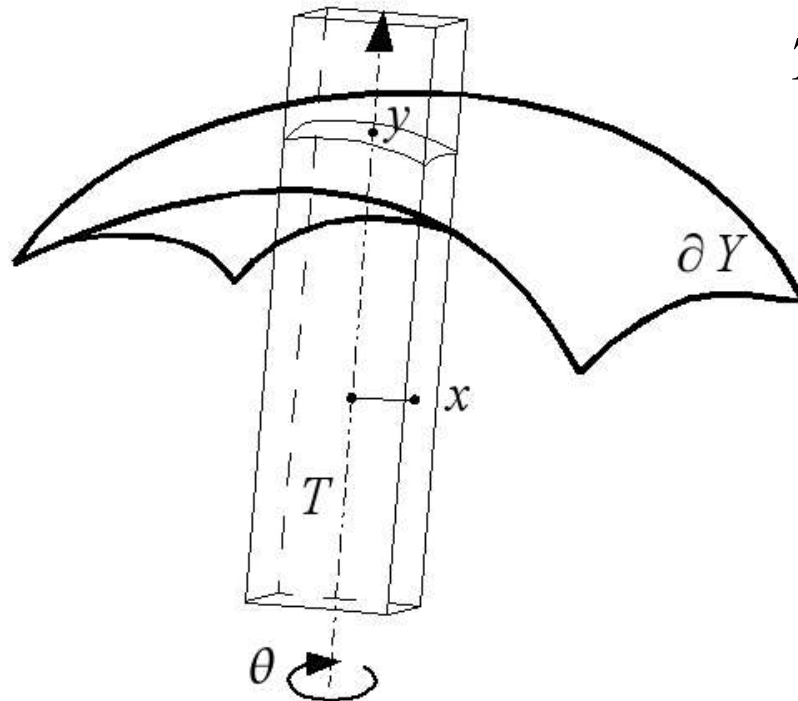
→ Expression équivalente pour la forme fonctionnelle

- Il faut calculer la probabilité d'échantillonnage de chaque point

# Probabilité d'échantillonnage en 3D

Dépend de la position et de l'orientation de la sonde :

$$P[x \in T | Y] = E_{y, \theta} [\lambda(y) I_{T(y, \theta)}(x) | Y]$$



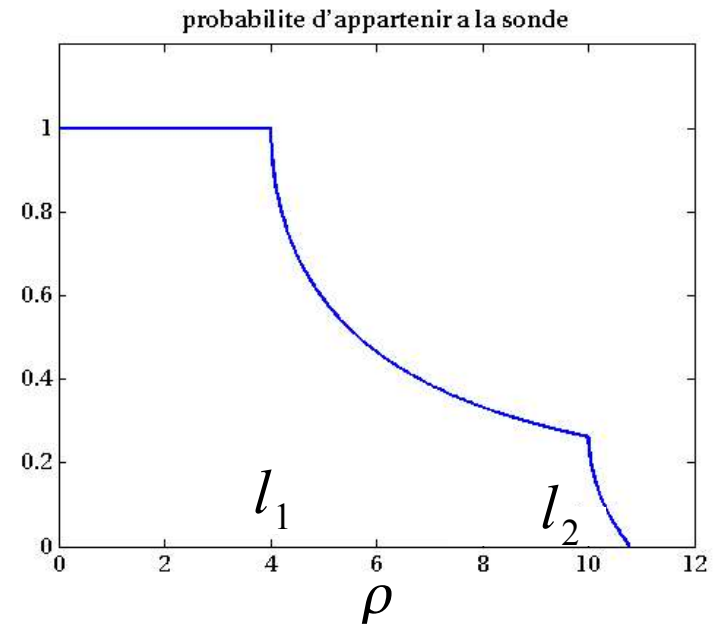
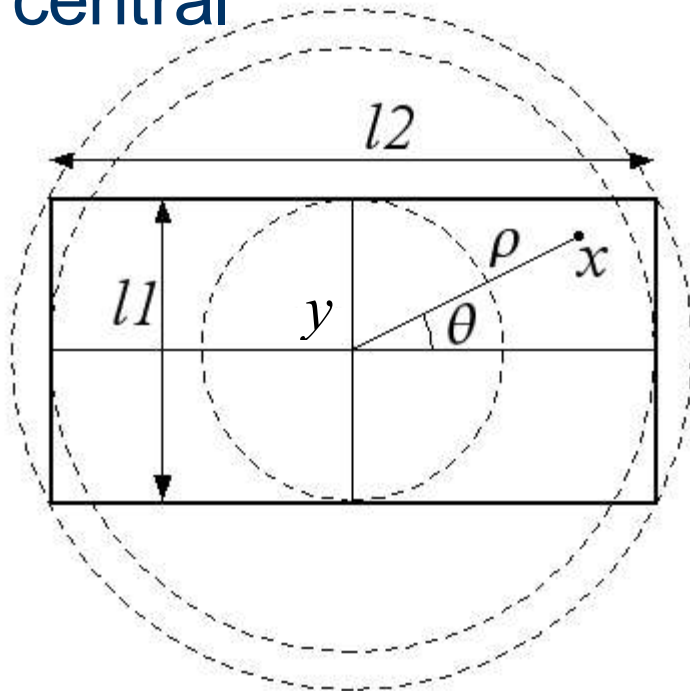
$T(y, \theta)$  : Sonde centrée en  $y$  et d'orientation  $\theta$

$\lambda(y)$  : Densité surfacique des points d'acquisition

$\partial Y$  : frontière du péricarpe

# 1 - Espérance conditionnelle sachant $y$

- La probabilité conditionnelle d'appartenir à une sonde centrée en  $y$  dépend de la distance à l'axe central



## 2 – Intégration de la probabilité conditionnelle

Calcul de la distance à l'axe normal par paramétrisation locale de la surface

La probabilité d'échantillonnage dans le cas général est finalement donnée par :

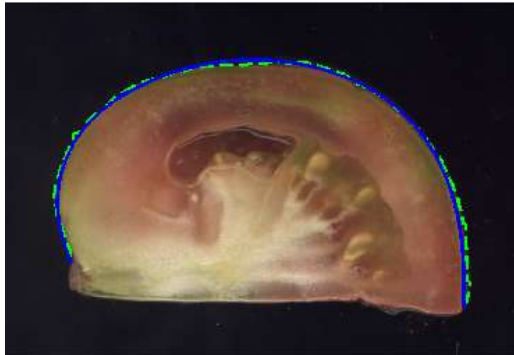
$$P[x \in \mathbf{T} | \mathbf{Y}] \simeq \lambda_0 \frac{l_1 \cdot l_2}{(1 - \kappa_1 p)(1 - \kappa_2 p)}$$

On doit connaître :

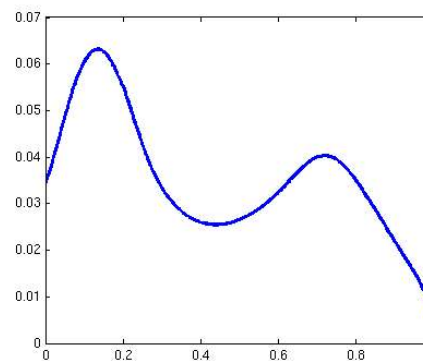
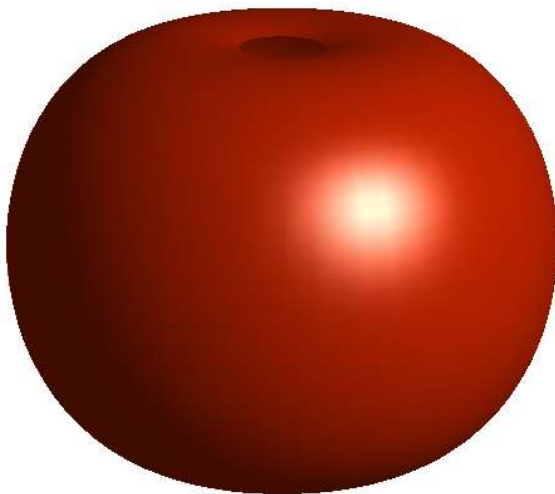
- La profondeur (mesurée dans l'image)
- Les courbures locales
- La densité surfacique des sondes



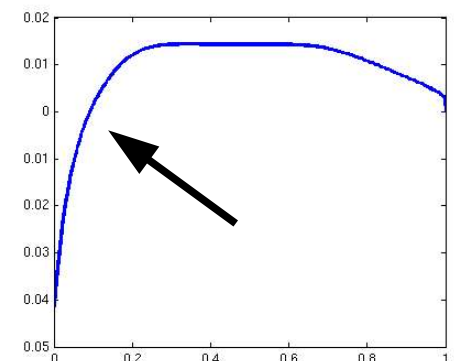
# Calcul des courbures de la tomate



- Scan et paramétrisation des quartiers de tomate
- Utilise un contour moyen
- Courbures en fonction pos. géodésique

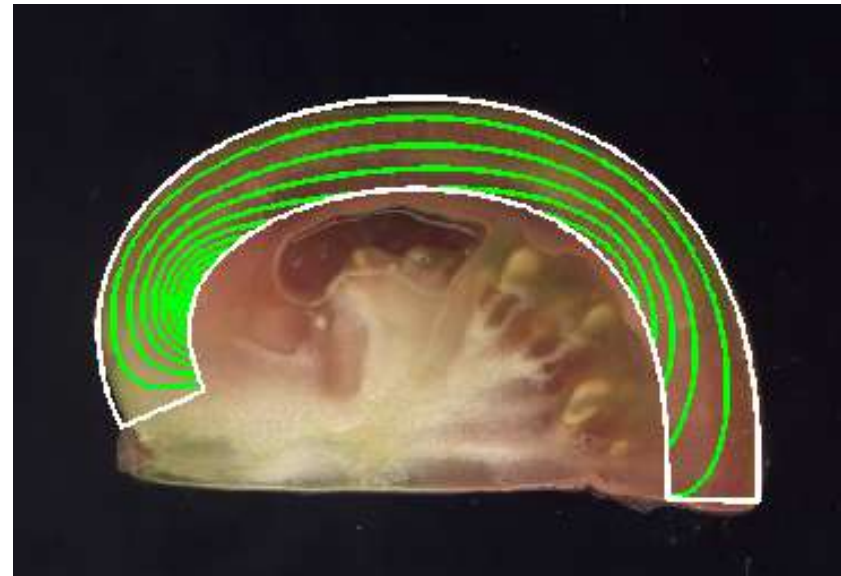
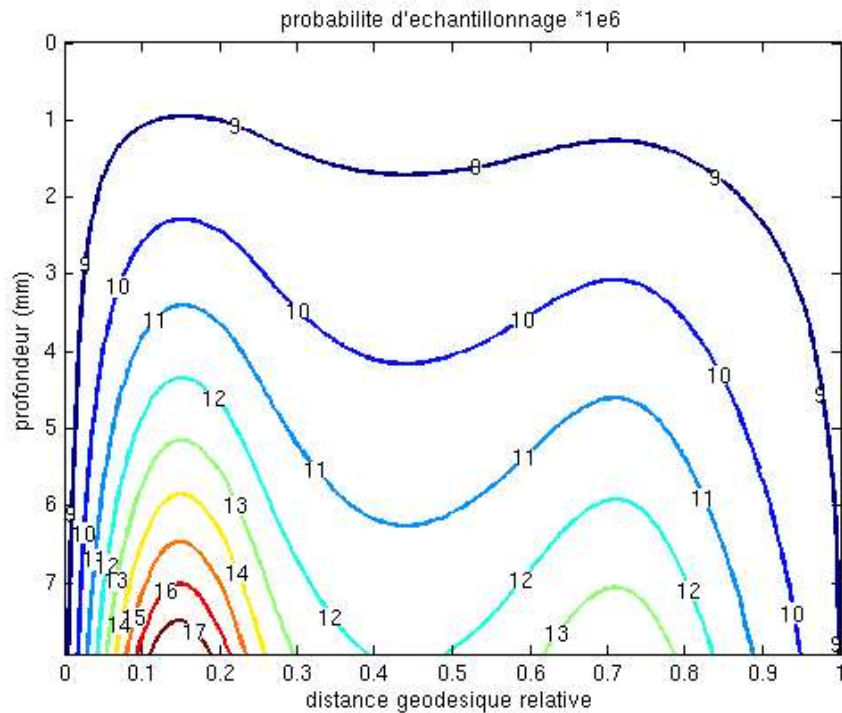


Pos. Géod.



Pos. Géod.

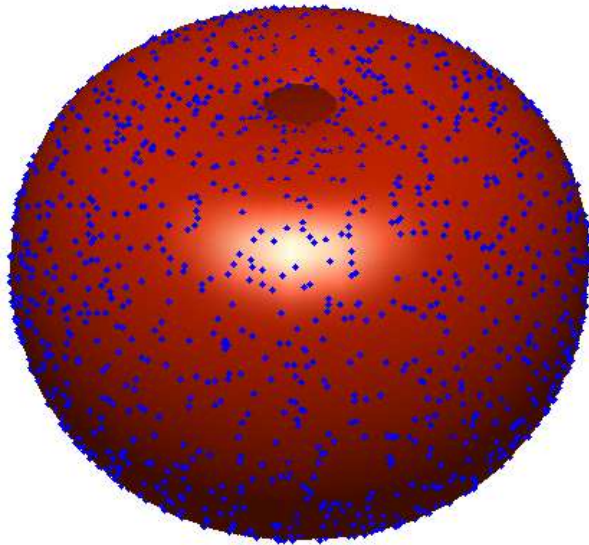
# Calcul de la probabilité d'échantillonnage



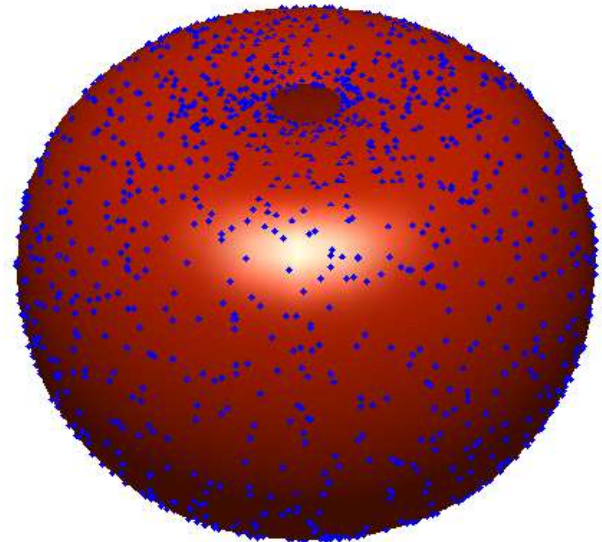
Rayon de courbure min : 15 mm

# Distribution surfacique des points d'acquisition

- Densité surfacique uniforme



- Densité uniforme sur la position géodésique



Densité surfacique inversement proportionnelle à la distance à l'axe

# Conclusion : développements méthodologiques

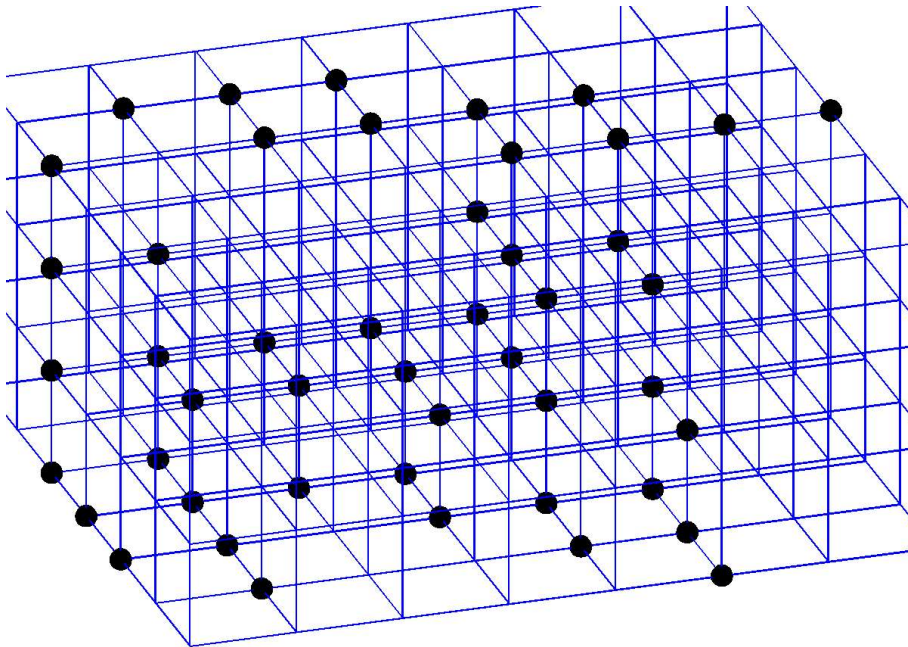
- Développement d'estimateurs
  - Des paramètres géométriques globaux,
  - De leurs densités,
  - Pour échantillonnage adapté à la forme de la structure,
  - Sans biais,
  - Exprimés sous une forme fonctionnelle,
  - Assez généraux (surface de révolution lisse)

# Plan de l'exposé

- Morphométrie des cellules du péricarpe
- Procédure d'estimation
- **Implémentation**
- Comparaison de lignées

# Structures discrètes 3D

L'information n'est disponible que pour les sommets de la grille de discrétisation



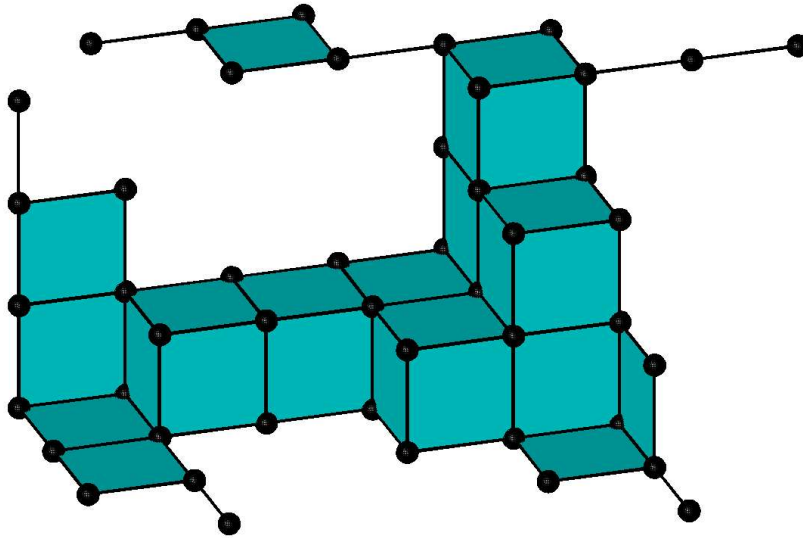
Problème : comment exprimer les paramètres pondérés :

$$V(\varphi), S(\varphi), \bar{b}(\varphi), \chi(\varphi)$$

à partir d'un ensemble de points distincts ?

# Structures discrètes 3D

L'information n'est disponible que pour les sommets de la grille de discrétisation



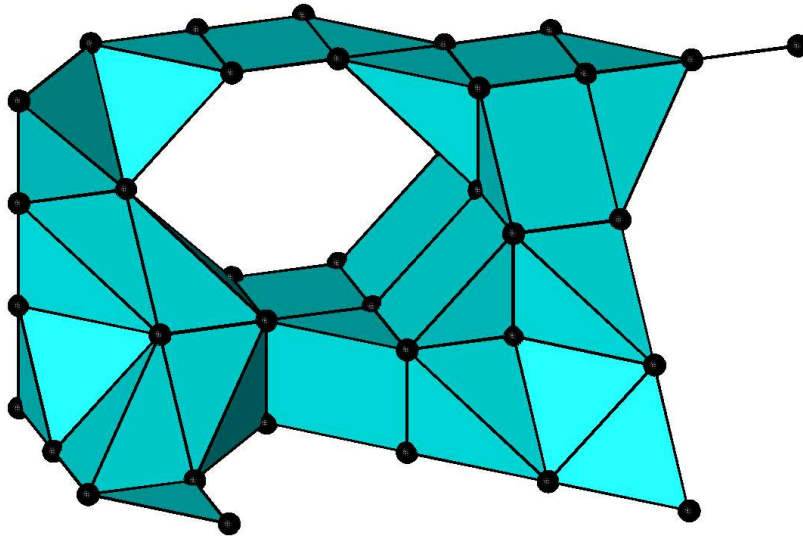
Problème : comment exprimer les paramètres pondérés :

$$V(\varphi), S(\varphi), \bar{b}(\varphi), \chi(\varphi)$$

à partir d'un ensemble de points distincts ?

# Structures discrètes 3D

L'information n'est disponible que pour les sommets de la grille de discrétisation



Problème : comment exprimer les paramètres pondérés :

$$V(\varphi), S(\varphi), \bar{b}(\varphi), \chi(\varphi)$$

à partir d'un ensemble de points distincts ?



# Mesure pondérée de la caractéristique d'Euler-Poincaré

- Calcule la caractéristique d'Euler-Poincaré de la reconstruction

$$\chi(\varphi) = \int_{\partial X} \varphi(x) g(x) dx \simeq \sum_{\text{sommet } x} \varphi(x) k(x)$$

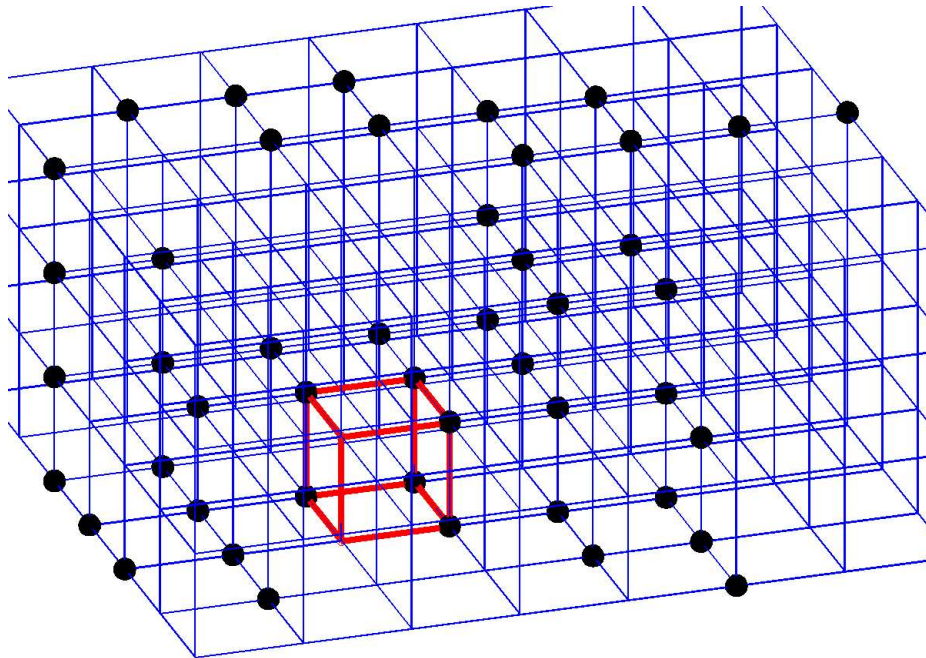
- Exprime la courbure discrète  $k(x)$  à partir des angles normaux des faces Banchoff (1967)
- Si  $\varphi(x) = 1$  (cas global), on retrouve les formules classiques (Serra, 1982 ; Ohser et Mücklich, 2000...)

# Surface et épaisseur moyenne

- Formules de Crofton :
  - ♦ Surface = intégrale de la caractéristique d'Euler-Poincaré sur des droites
  - ♦ Épaisseur moyenne = intégrale de la caractéristique d'Euler-Poincaré sur des plans
- Pour les images discrètes :
  - Somme sur les 3 ou 13 droites ou plans contenant un sommet
  - Calcul à partir formule de Banchoff (en 1D ou 2D)

# Mise en œuvre pratique

- Il est possible de calculer les courbures en parcourant les mailles (=2x2x2 pixels) de l'image



# Plan de l'exposé

- Morphométrie des cellules du péricarpe
- Procédure d'estimation
- Implémentation
- **Comparaison de lignées**

# Matériel biologique

- Été 2004 : deux lignées (sauvage et génétiquement modifiée)
  - Différence de fermeté et de maturation
  - Division cellulaire plus importante dans la zone sous-cuticulaire pour la lignée antisens
- Nombre d'images :
  - 10 tomates de chaque lignée
  - 4 acquisitions par tomate

Jones et al. (2004)

# Segmentation des images

- Correction décroissance intensité lumineuse (Kervrann, 2004)
- Amélioration de l'intensité des parois
- Détection et filtrage des marqueurs
- Segmentation : ligne de partage des eaux

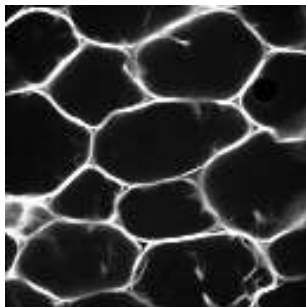
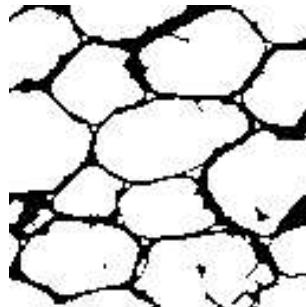
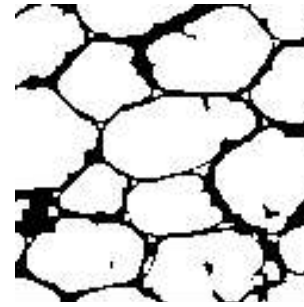


Image améliorée



Détection  
des minima

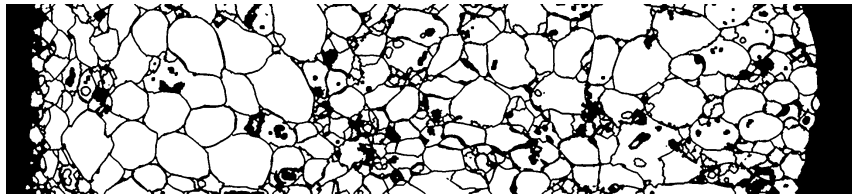


Traitement des minima

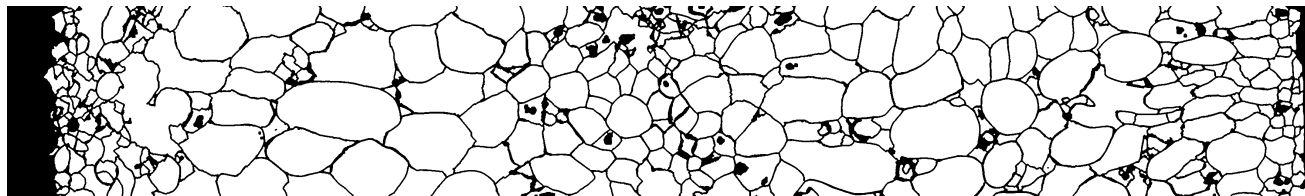
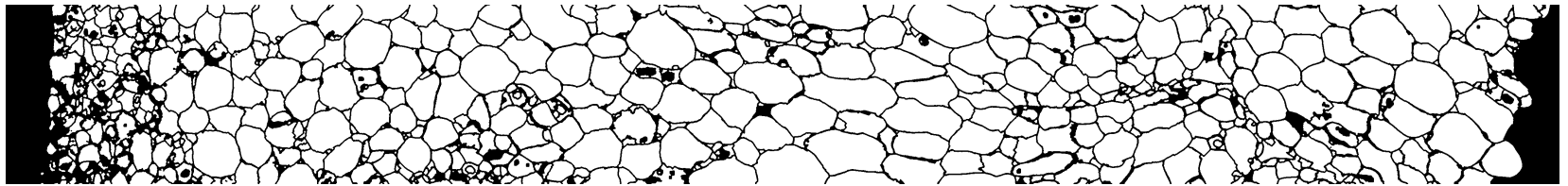


LPE

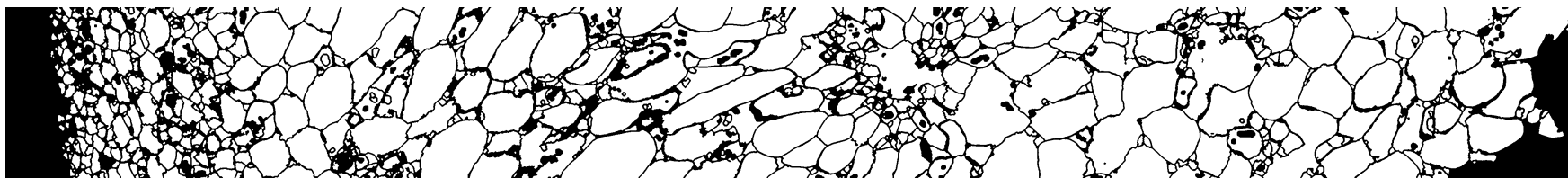
# Résultats de segmentation



Lignée sauvage



Lignée  
antisens



# Estimations globales pour deux lignées de tomates :

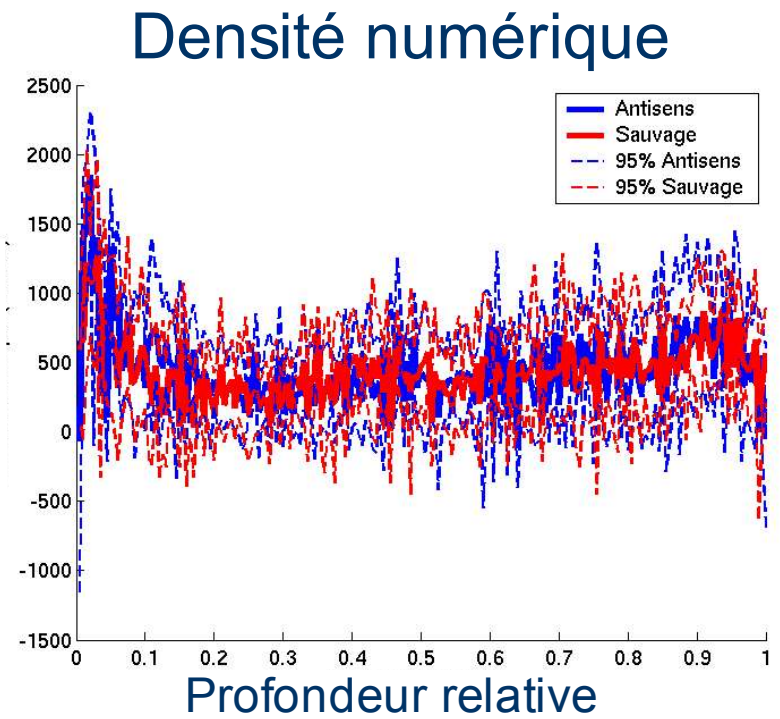
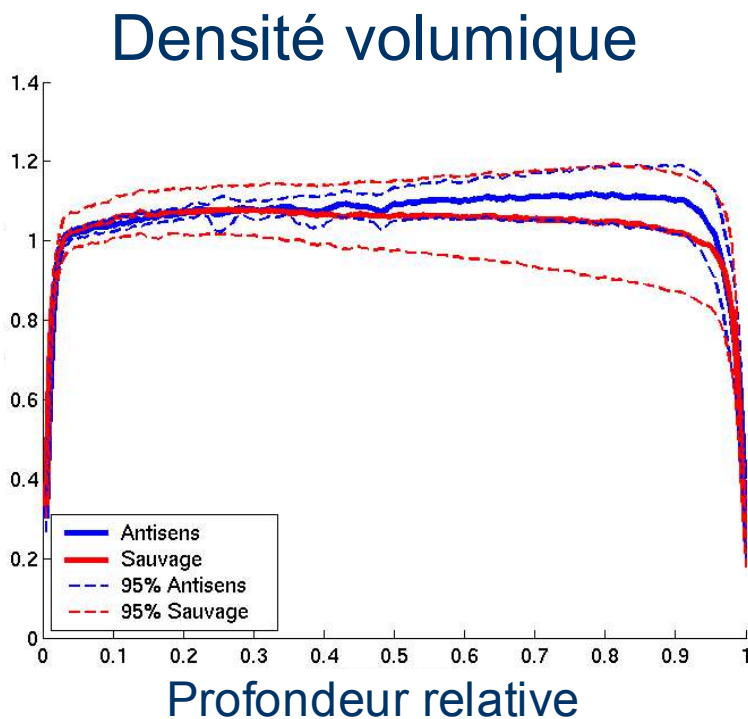
Lignée	Volume (cm <sup>3</sup> )	Surface (m <sup>2</sup> )	Épaisseur (km)	Nombre (millions)
Antisens	74.7 (4,3)	2.94 (0,20)	8.8 (0,7)	32.9 (3,7)
Sauvage	59 (3,1)	2.31 (0,12)	6.9 (0,4)	24.7 (2,0)
p-valeurs (%)	0,4 **	0,4 **	2,4 *	10

- Volume, surface et épaisseur moyenne des particules : effet significatif de la lignée
- Péricarpe plus épais chez la lignée mutante
- Densités globales équivalentes
- Nombre de cellules (Bertin et al.) : 10 millions



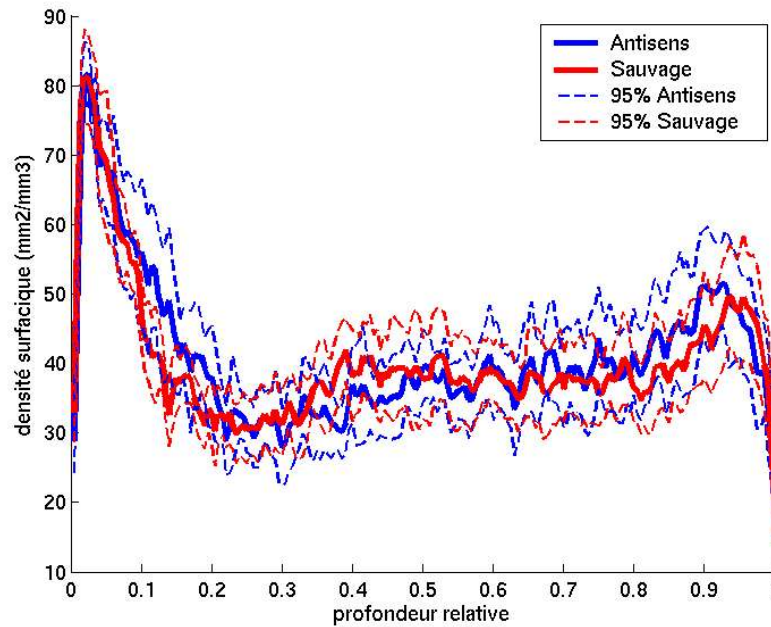
# Profils de densité (1)

Normalisation des profils par rapport à l'épaisseur du péricarpe

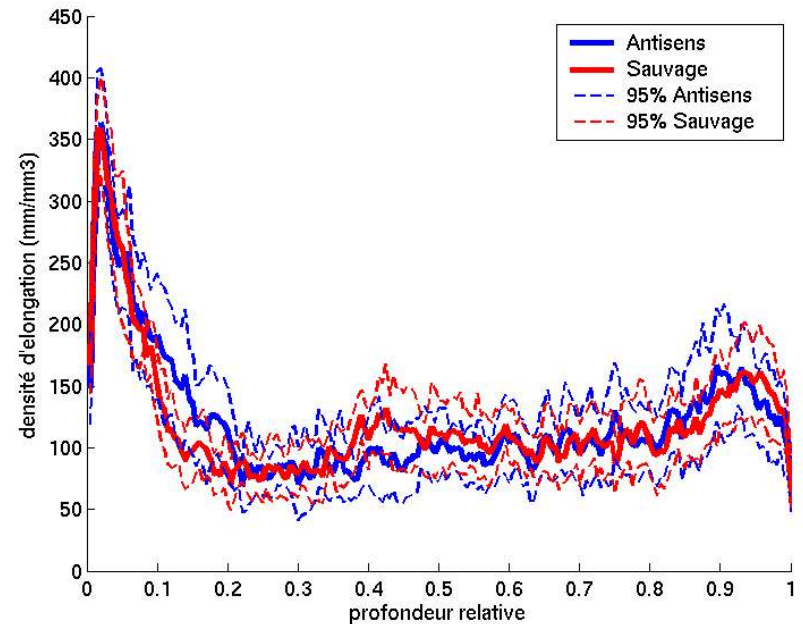


# Profils de densité (2)

## Densité surfacique

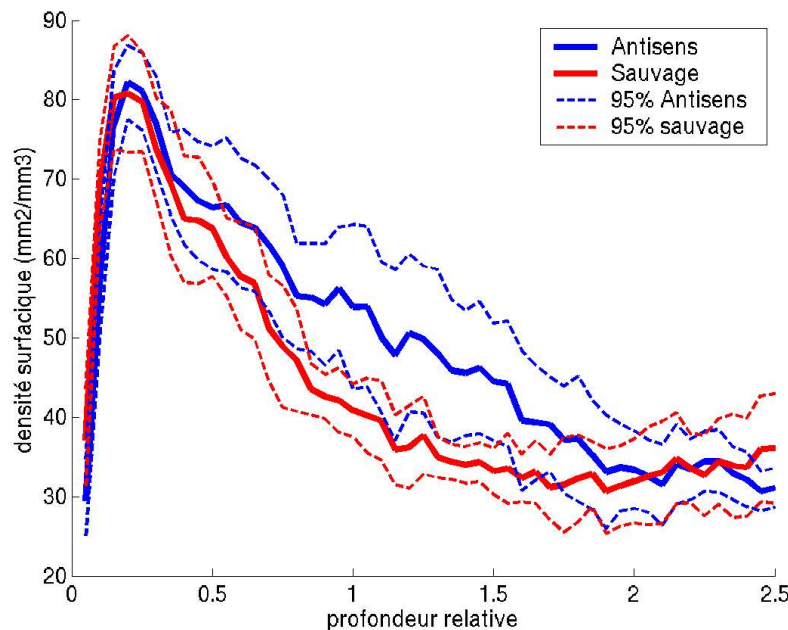


## Densité d'épaisseur



# Profils de densité surfacique tronqués

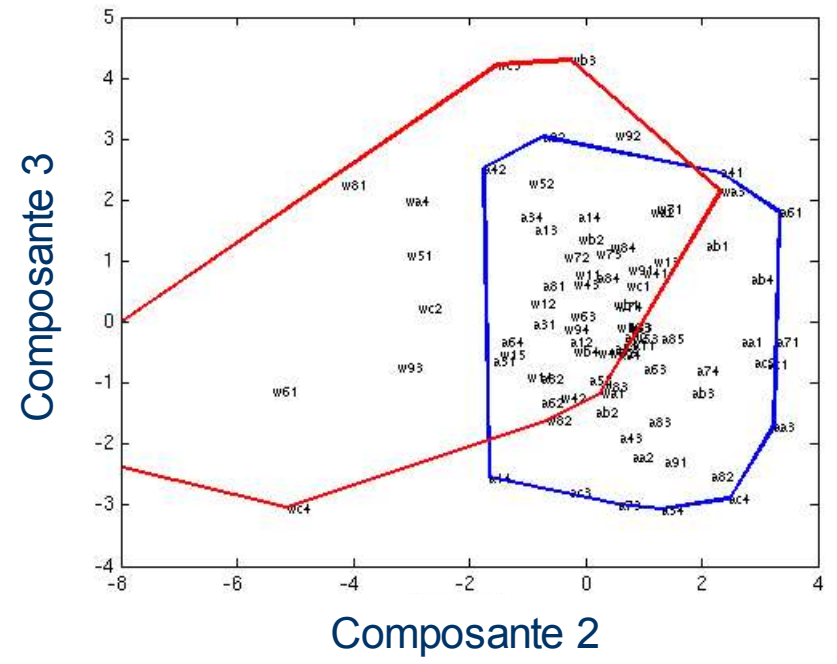
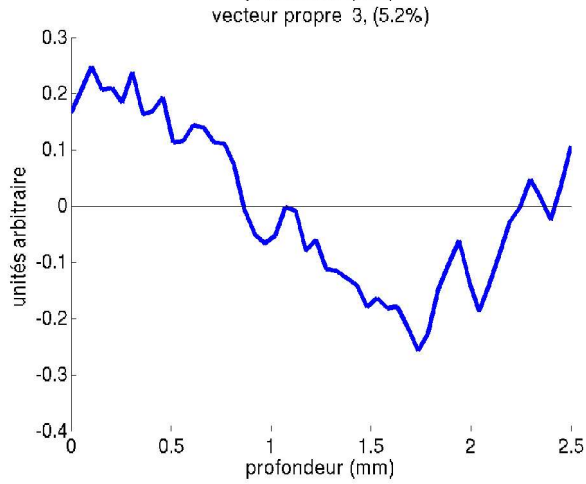
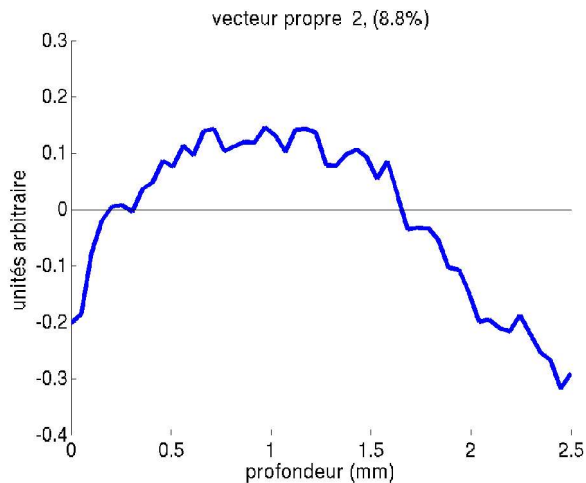
- Analyse en composantes principales des profils
- Analyse de variance sur les composantes



## Effet de la lignée significatif

Composante	Inertie (%)	Lignée	Position
Cp1	60,1	3,1 *	<0,1 ***
Cp2	8,8	0,4 **	30,6
Cp3	5,2	0,4 **	13,6

# Vecteurs propres des profils de densité de surface tronqués



# Conclusion sur l'application à la tomate

- Particules du péricarpe :
  - Morphométrie dans le fruit entier :  $V, S, \bar{b}$  et  $\chi$
  - Localisation en fonction de la profondeur
  - DR12 : mise en évidence d'une différence de densité surfacique des parois
  - Variabilité importante des estimations

# Conclusion

- Mise en place d'une chaîne complète
  - Acquisition, échantillonnage, traitement d'images, estimation, et analyse des résultats
  - Permet caractérisation morphométrique 3D
  - Permet caractérisation locale
  - Générique, et applicable à d'autres produits
- Apport de l'imagerie 3D :
  - Nécessaire pour estimer certains des paramètres
  - Grande variabilité si l'épaisseur observée est faible

# Perspectives envisagées

- Appliquer à d'autres matériaux (autres fruits, pain, organes...)
- Étendre les estimateurs :
  - Adapter à des mesures sur des coupes 2D
  - Estimer moments d'ordre supérieurs
  - Incorporer un modèle géométrique (tessellations)
- Alimenter des modèles mécaniques
  - Intégrer données biochimiques
  - Morphométrie avec contraintes mécaniques
  - Expliquer les caractéristiques sensorielles...