

Développement d'un système d'analyse des ondes flagellaires par ordinateur : intérêts et perspectives.

D. SCHOEVAERT

Unité de Microscopie Quantitative, Laboratoire d'Histologie Embryologie Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction, CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre (France)

RESUME

Nous présentons une méthode d'analyse morphodynamique des ondes flagellaires par analyse d'image. Cette méthode permet d'obtenir une description objective de la déformation flagellaire. Les séquences d'images analysées sont obtenues par micro vidéographie à hautes vitesses. Les axes flagellaires sont extraits automatiquement par une méthode de suivi de ligne de crête, puis modélisés par des splines. Ce modèle permet de calculer les paramètres dynamiques de propagation et de formation des ondes. Cette approche permet une meilleur compréhension des mécanismes du mouvement et la détection d'anomalies morphofonctionnelles.

Mots clefs : spermatozoïdes, onde flagellaire, analyse d'image, modélisation.

INTRODUCTION

La dynamique flagellaire peut exprimer de manière amplifiée les anomalies structurales et les perturbations fonctionnelles du spermatozoïde. L'analyse des ondes apporte donc des informations irremplaçables sur les mécanismes du mouvement et leur régulation. Elle permet aussi de préciser les origines morphofonctionnelles des dyskinésies et de détecter des anomalies échappant aux techniques classiques d'investigation.

Malheureusement, l'appréciation de cette dynamique par des systèmes non informatisés est fastidieuse et subjective. La principale difficulté est que les phénomènes de formation de propagation et de relâchement des ondes principales et reverses se déroulent à des échelles spatiales et temporelles qui les rendent difficilement accessibles à l'observation. L'utilisation de dispositifs d'acquisition et d'enregistrement à hautes vitesses s'avère nécessaire (100 à 400 images par seconde). Différents supports d'enregistrements ont été utilisés :

- la micro photographie couplée avec un stroboscope (200 Hz) permet d'enregistrer une séquence de battement sur un film animé d'un mouvement de translation [2]. On peut utiliser une platine motorisée [3].
- La micro cinématographie hautes vitesses (300 images/seconde) permet d'enregistrer un plus grand nombre de cycles [4].
- la micro vidéographie hautes vitesses est le support le plus approprié pour cette analyse.

Différentes méthodes d'analyse automatique des ondes ont été proposées. Certaines d'entre elles nécessitent un échantillonnage manuel de points le long de l'axe flagellaire [2], d'autres permettent d'obtenir ces points automatiquement [2, 8, 10]. Le calcul des paramètres dynamiques à partir des points échantillonnés nécessite une modélisation de l'axe par un modèle continu. BROKAW a

proposé un modèle par arc de cercle [2], Baba a utilisé un modèle sinusoïdal [2] ces deux modèles reposant sur des contraintes de régularités et de symétries ne peuvent être utilisés de manière satisfaisante pour l'analyse des spermatozoïdes humain.

Notre objectif a été de réaliser un système d'analyse et de modélisation adaptable à plusieurs types de battements flagellaires et ceci pour répondre de manière plus satisfaisante aux besoins de la recherche et de la routine.

MATERIEL

Le sperme est placé dans une cuve de 5 microns de profondeur recouverte d'une lamelle couvre objet. Cette cuve est placée sous un microscope (REICHERT, UNIVAR , objx25) équipé d'un contraste de phase. Une caméra CCD hautes vitesses (LHESA-Electronic) est fixée sur le microscope (Figure 1). Les images filmées sont enregistrées par un magnétoscope (PANASONIC AG7530) piloté par l'ordinateur par une interface RS232. Les images vidéo enregistrées sont stabili-

sées par un correcteur de base de temps (FOR@) avant d'être numérisées par une carte de traitement d'image (MATROX ,PIP 1024B) implantée dans un micro-ordinateur PC 486 DX33 (4 MO de RAM). Les images sont visualisées sur un écran vidéographique à haute fréquence de balayage (SONY). Les résultats sont affichés sur un écran graphique SVGA et imprimés sur une traceur de courbe (HEWLETT PACKARD HP 7440). Les logiciels que nous avons développés en langage C utilisent les fonctions MATROX de la librairie MLL.LIB. Le logiciel SIGMA-PLOT permet de traiter les graphiques et STAT 2005 (ALCATEL-TITN) permet le traitement statistique des résultats.

METHODE

L'analyse des ondes flagellaires repose sur une reconstruction du mouvement à partir d'une séquence d'images fixes. Cette reconstruction comporte plusieurs étapes :

1. Acquisition d'une séquence d'images

Le champ d'observation est filmé pendant quelques secondes. Les séquences sont

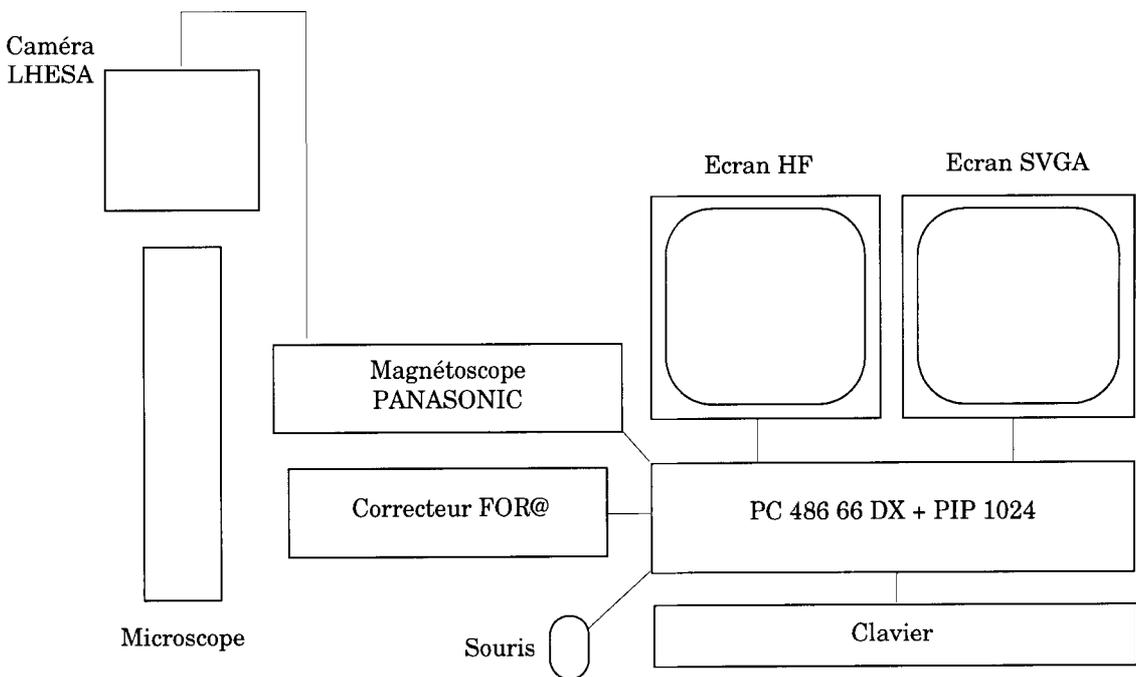


Figure 1 : Configuration du système d'analyse.

enregistrées sur cassette vidéo. Chaque image est numérisée en 512x512 pixels avec une dynamique de 256 nuances de gris. L'analyse image par image de la séquence se limite généralement à une cinquantaine d'images.

2. Extraction de l'axe flagellaire

Les points situés sur l'axe médian du flagelle sont extraits automatiquement par une méthode de suivi de ligne de crête. L'image en niveaux de gris peut être représentée dans l'espace tridimensionnel par une fonction relief (Figure 2) dans laquelle l'altitude (axe z) correspond au niveau de gris et les deux autres axes (x et y) correspondent au plan de projection de l'image. Le flagelle apparaît dans cette représentation comme une crête sinueuse dont l'altitude décroît régulièrement du point d'attache à l'extrémité flagellaire (Figure 1). La procédure itérative que nous avons développée consiste à

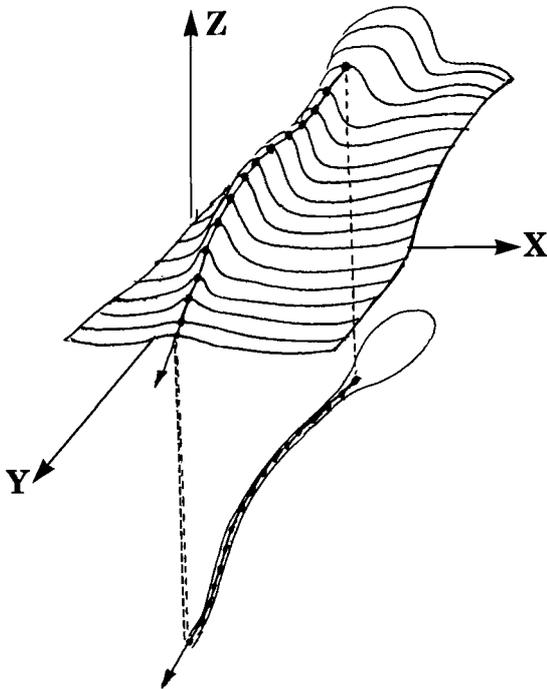


Figure 2 : Extraction de l'axe flagellaire. Le plan xy correspond au plan de projection de l'image, l'axe z correspond aux niveaux de gris des points images. L'axe recherché correspond à la ligne de crête.

un parcours pas à pas de cette crête en partant de la tête. A partir d'une position courante sur la ligne de crête, la position suivante est recherchée dans un secteur de probabilité de présence qui tient compte des contraintes de courbures flagellaires. La position retenue est celle qui présente la plus petite dénivellation avec le point courant. Le processus est réitéré en prenant pour point courant le dernier point échantillonné. L'opérateur doit initialiser le processus en désignant interactivement le sommet de la tête et la base de la tête spermatique. A la fin du processus on obtient une cinquantaine de points échantillonnés le long de l'axe flagellaire.

MODELISATION

L'analyse des paramètres dynamiques nécessite de remplacer la représentation discrète (en pixels) par un modèle continu dans l'espace et le temps. Nous avons utilisé les splines naturelles à pôle pour modéliser les battements flagellaires. Deux étapes sont nécessaires à la construction du modèle :

- une modélisation spatiale (2D) de chaque instantané par des splines d'approximation de Yamaguchi,
- une modélisation spatio-temporelle (2D+) qui consiste à construire une surface spline d'interpolation s'appuyant sur les splines d'approximation [10, 12] (Figure 3).

PARAMETRISATION

Les paramètres des ondes flagellaires, vitesses de formation de propagation et de relâchement des ondes ainsi que leurs rayons de courbures sont calculés à partir des dérivées premières et secondes du modèle. Le programme donne aussi les paramètres trajectographiques du centre de gravité de la tête spermatique; vitesse de progression (VP), vitesse instantanée, amplitude de débattement (AH), [9] ainsi que les corrélations entre les paramètres flagellaires et trajectographiques.

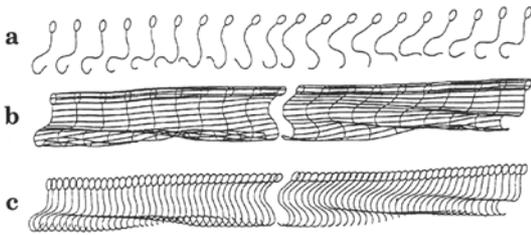


Figure 3 : Modélisation de l'axe flagellaire :
 (a) *Spline d'approximation à différents temps.* (b) *Surface d'interpolation spline.*
 (c) *Découpage de la surface spline.*

RESULTATS

Notre méthode a été utilisée pour étudier avec plus de précision et d'objectivité, les phénomènes de battements ciliaires et flagellaires. Elle nous a permis de comparer ces deux types de battements [11]. Nous avons montré la similitude de la cinétique d'évolution des ondes. Les phases de formation de propagation et de relâchement se retrouvent dans les deux systèmes. Les seules différences concernent la courbure de l'onde ciliaire qui se développe et qui progresse plus rapidement (1000 microns /seconde) et devient maximale aux deux tiers de la longueur. La courbure de l'onde flagellaire se développe plus lentement (500 microns/ seconde) et n'atteint sa valeur maximale qu'à l'extrémité flagellaire. Cette différence pourrait s'expliquer par les différences structurales des deux organites. Cette méthode a été utilisée pour étudier les effets de la déplétion en ATP sur la dynamique flagellaire [5] et pour préciser le rôle de la L-carnitine libre et de l'acetyl-L-carnitine dans la maturation testiculaire des spermatozoïdes [4].

DISCUSSION

L'analyse des ondes flagellaires pose des problèmes de résolution spatiale et temporelle spécifiques. Les images formées au microscope à contraste de phase doivent être acquises avec une caméra à hautes vitesses équipée d'un obturateur ultra rapide et d'un intensificateur. Le choix de la

vitesse d'acquisition (de 100 à 400 images par seconde) dépend de la fréquence des battements flagellaires des spermatozoïdes analysés. La durée de la séquence doit correspondre à celle de 3 cycles de battements (10 images au minimum par cycle). L'enregistrement sur magnétoSCOPE PAL-SVHS permet de conserver les documents pour une analyse en différé. Notons qu'il est maintenant possible d'enregistrer les séquences directement en mémoire RAM (ou sur le disque dur) de l'ordinateur ; cette technique permet de repositionner très précisément les images et de minimiser les dégradations de résolution. L'ordinateur doit être équipé, pour ce faire, d'une carte de numérisation temps réel (MATROX magic), d'une mémoire RAM 16Mo (ou d'une mémoire de masse de grande capacité) et d'une ligne de transfert de données (32bits) à grand débit (33 Mhz) (bus EISA, PCI ...). Pour être conforme au standard d'enregistrement et d'analyse la caméra doit fournir des images à la cadence de 50 hertz. Une solution consiste à recomposer les images standards à partir d'une série d'images acquises à hautes vitesses de plus petites tailles. L'acquisition de la moitié du champ d'observation permet ainsi d'obtenir des images avec une fréquence double (100 Hz). En divisant le champ par quatre, il est possible d'atteindre, en choisissant les spermatozoïdes convenablement orientés, une fréquence de 200 Hz. Cette méthode à l'avantage d'être peu coûteuse.

La modélisation est indispensable pour donner une description quantitative de la dynamique de formation et de propagation des ondes. Le modèle par arc de cercle proposé par BROKAW [2] et le modèle sinusoïdal de BABA [1] sont simples à mettre en œuvre. Malheureusement, ces modèles reposent sur des hypothèses de régularités de courbures qui ne peuvent être appliquées aux spermatozoïdes de mammifères. La modélisation par des splines, que nous proposons, repose sur l'hypothèse selon laquelle les énergies de flexion se répartissent de façon homogène le long de l'axe flagellaire. Ce qui

correspond à une minimisation des énergies de courbures. Cette hypothèse s'appuie sur la vraisemblance d'un équilibre énergétique constant le long du complexe axonémal lors de la formation et de la propagation des ondes. Ce modèle paramétrable peut s'ajuster précisément aux différents types de battements (hyperactivé ...) Il permet d'obtenir une représentation très compacte du mouvement. Ainsi des séquences complètes peuvent être stockées dans une banque d'images avec un facteur de compression de 1000 !. Ce modèle peut être utilisé pour l'analyse tridimensionnelle de la courbure ; malheureusement, il est actuellement très difficile d'obtenir des données en dehors du plan focal. La microscopie confocale à balayage laser n'étant pas suffisamment rapide pour acquérir une séquence d'image à très haute fréquence (> 5000 Hz). L'analyse multispectrale qui consiste à différencier les plans focaux par des tranches lumineuses de différentes longueurs d'onde, ne donne pas une résolution suffisante pour construire un modèle tridimensionnel. La composante tridimensionnelle n'intervenant principalement que dans la phase de relâchement, le modèle bidimensionnel reste acceptable pour estimer les paramètres de courbures.

La rapidité de l'analyse (3 cycles de battements en moins de dix minutes) permet une étude plus systématique de la dynamique flagellaire. Les résultats biologiques obtenus sur différents modèles nous ont permis de décrire très finement la déformation flagellaire ainsi que les effets de substances actives sur les mécanismes du mouvement.

BIBLIOGRAPHIE

1. BABA S.A., MOGAMI Y. : An approach to digital image analysis of bending shapes of eukaryotic flagella and cilia. *Cell. Motil.*, 1985, 5 : 475.
2. BROKAW C.J. : Automated methods for estimation of sperm flagellar bending parameters *Cell. Motil.*, 1984, 4 : 417.
3. CHEVRIER C., DACHEUX J.L. : Analysis of the flagellar bending waves of ejaculated ram sperm. *Cell. Motil.*, 1987, 8 : 261.

4. DAVID G., SERRES C., JOUANNET P. : Kinematics of human spermatozoa. *Gamet Res.*, 1981, 4 : 83.
5. JEULIN C., SCHOEVAERT D. : Effects of ATP depletion on the formation and propagation of the flagellar waves in intact rat spermatozoa ; manual and computer image analysis of high speed videomovies, *Cell Mot. Cytoskeleton*, 1992, 23, 304-309
6. JEULIN C. : Rôle de la L-carnitine libre et de l'Acetyl-L carnitine dans la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes de mammifères. Thèse de doctorat, Université Paris VI, 1994.
7. MARANO F., KRISHNASWAMY S., BETRENCOURT C., SCHOEVAERT D., PROVOST J.M., VOLOCHINE B. : Control of ciliary beat by calcium: the effects of lindane a potent insecticide. *Biol. Cell.*, 1988, 63 : 143-150.
8. RIKMENSPOEL R., ISLES C.A. : Digitized precision measurements of the movements of sea urchin sperm flagella. *Biophys. J.*, 1985, 47 : 395.
9. SCHOEVAERT D. : Automated analysis of human sperm motility. *Comput. Biomed. Res.*, 1984, 17 : 362-375.
10. SCHOEVAERT D., KRISHNASWAMY S., COUTURIER M., MARANO F. : Ciliary beat and cell motility of high speed microcinématographie. *Biol. Cell.*, 1988, 62 : 229-240.
11. SCHOEVAERT D., MARANO F., SERRES C., BERREBAH H. : A new automated method of image analysis: comparisons of ciliary and flagellar beats. *Biorheology*, 1990, 27 : 567-579.
12. SCHOEVAERT D. : Analyse et modélisation dynamique: application à l'analyse du mouvement des cellules ciliées et flagellées. Thèse de doctorat, Université Paris XII, 1990.

ABSTRACT

Development of image analysis system of flagellar waves : interests and perspective

D. SCHOEVAERT

An automated method of image analysis of spermatozoa flagella bends is presented. This method allows to obtain quantitative description of formation and propagation of principal and reverse waves. This method is based on dynamic image analysis of sequence of images acquired by high speed videomicrography. The method permit and automatic determination of line characterizing the flagellum skeleton by tracking a line of grey level function.

The flagellum skeleton are modeled by approximation and interpolation spline. Dynamics parameters derived of this model are : the propagation velocity and the curvature radius of principal and reverse waves, trajectory parameters of the head centroid. This method allows to build a

compacted image data bank. This approach allows a better comprehension of movement mechanism and the detection of morphological and functional abnormalities

Key words : spermatozoa, flagellar waves, image analysis, modelisation.