HAL
open science

Étude de la morphologie ostéocytaire

Jean-Christophe Souplet, Gaël y Rochefort, Rustem Uzbekov, Nicola L Fazzalari, Claude-Laurent Benhamou, Stéphane Pallu

To cite this version:

Jean-Christophe Souplet, Gaël y Rochefort, Rustem Uzbekov, Nicola L Fazzalari, Claude-Laurent Benhamou, et al.. Étude de la morphologie ostéocytaire. JFBTM 2011, May 2011, Paris, France. hal-02190602

HAL Id: hal-02190602

https://hal.science/hal-02190602v1

Submitted on 25 Jul 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Étude de la morphologie ostéocytaire

SOUPLET Jean-Christophe[1], ROCHEFORT Gaël Y[1], UZBEKOV Rustem[2], FAZZALARI Nicola L[1,3], BENHAMOU Claude-Laurent[1], PALLU Stéphane[1]

[1] U658, INSERM, Orléans, [2] Departement de microscopie, Université de Tours, Tours.
[3] Bone and Joint Research Laboratory, Adelaide, Australia

Les ostéocytes représentent 95% des cellules osseuses de l'os cortical. Comme toute cellule, ils sont affectés par différents facteurs : maladies, vieillissement, activité physique... Un effet de ces facteurs semble correspondre à des variations de la forme de ces cellules. Il convient donc d'étudier la morphométrie ostéocytaire.

Toutefois, caractériser la forme de ces cellules sur une vaste base d'images 2D est un travail fastidieux et dont la reproductibilité reste délicate. Pour y remédier, nous avons développé une méthode d'analyse : le logiciel ChocINSERM. Celui-ci permet d'ouvrir et de visualiser une série d'images. L'utilisateur peut aisément alors passer d'une image à l'autre, zoomer et changer le fenêtrage (i.e. la palette de couleurs visualisées). Pour chaque image (i.e. cellule), l'utilisateur est invité à remplir une liste de critères qualitatifs (e.g. présence ou non de nécroses, cytoplasme intact ou non, ...). L'analyse se poursuit en indiquant au logiciel la taille de la barre d'échelle présente sur l'image et en la mesurant. A partir de ces données, l'utilisateur peut alors réaliser différentes mesures linéaires (e.g. longueur de l'axe court et de l'axe long : du noyau, de la cellule et de la lacune) ou surfaciques. Le calcul automatique de ces axes à partir du tracé manuel du contour de l'objet est également possible. ChocINSERM sauvegarde automatiquement toutes les mesures effectuées. L'ensemble de ces résultats peut être exporté dans un fichier de tableur pour réaliser par la suite une analyse statistique.

La méthodologie contenue dans le logiciel ChocINSERM a été validée en termes de précision. Celle-ci dépend de la résolution d'acquisition de l'image. Ainsi, l'erreur de mesure est inférieure à 2% tant que la mesure évaluée est supérieure à 10% de la mesure de la barre d'échelle. Concernant, les variabilités intra- et inter- experts, celles-ci sont réciproquement proches de 3% et de 5%. Les mesures d'axes calculées automatiquement à partir du contour de l'objet étaient les mesures les plus reproductibles.

Une étude sur une base de 69 images d'ostéocytes (de rats Wistar âgés de 4 mois) obtenues par microscopie électronique à transmission (MET) démontre l'intérêt du logiciel dans l'analyse de trois sous-groupes : mâles témoins, femelles témoins et femelles ovariectomisées. Une analyse factorielle discriminante basée sur 14 paramètres de morphologie fournis par ChocINSERM a permis de montrer qu'il était possible de classer correctement 84% des ostéocytes uniquement à partir de leur morphologie.

ChocINSERM est un logiciel déposé à l'agence pour la protection des programmes (en partenariat avec INSERM-Transfert). Il permet de quantifier la morphologie ostéocytaire (et plus largement cellulaire) de manière moins fastidieuse. Il a été validé et ses limites sont connues. Son application sur des images de MET a prouvé son intérêt. Il pourrait être appliqué à d'autres modalités.

Étude de la morphologie ostéocytaire

SOUPLET Jean-Christophe[1], ROCHEFORT Gaël Y[1], UZBEKOV Rustem[2], FAZZALARI Nicola L[1,3], BENHAMOU Claude-Laurent[1], PALLU Stéphane[1]

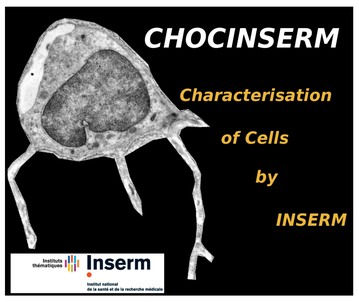
[1] U658, INSERM, Orléans, [2] Departement de microscopie, Université F. Rabelais, Tours, [3] Bone and Joint Research Laboratory, Adelaide, Australia

Introduction

• Les ostéocytes représentent 95% des cellules osseuses de l'os cortical. Comme toute cellule, les ostéocytes sont affectés par différents facteurs : maladies (ostéoporose, ostéopétrose, arthrose), vieillissement, activité physique.

• Un effet de ces facteurs semble correspondre à des variations de paramètres morphologiques de ces cellules.

• Il convient donc d'étudier la morphométrie 2D ostéocytaire.



Matériels et Méthodes

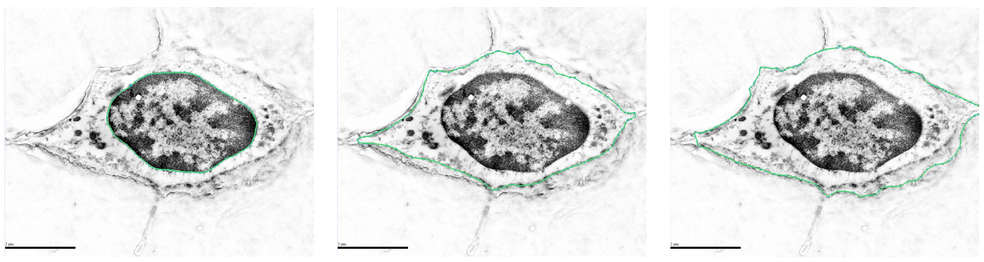
• 9 rats Wistar agés de deux mois en début d'expérience ont été répartis en trois groupes:

- un groupe male contrôle (4 rats, 40 images),
- un groupe femelle contrôle (2 rates, 12 images),
- un groupe femelles ovariectomisées (dès réception),(3 rates, 17 images).

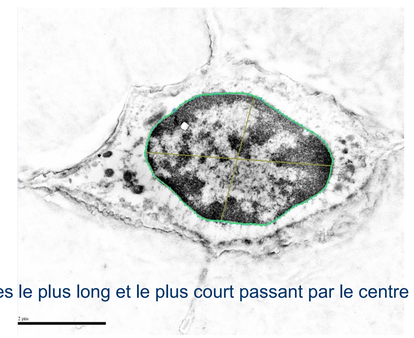
• Ces animaux sont sacrifiés à 4 mois. Les tibias sont prélevés et nettoyés de tout tissu mou. Ils sont fixés dans un tampon paraformaldéhyde 4% v/v, cacodylate sodium 0.2 M, des sections transversales osseuses (épaisseur : 300 microns) sont réalisées à l'aide d'une scie circulaire diamantée (Dremel, USA). Ces sections sont décalcifiées dans un tampon EDTA pH 7.4(Osteosoft, Merck, Allemagne), puis post-fixées et incluses en résine Epoxy selon un protocole de routine adapté à la microscopie électronique à transmission (MET). Des sections ultrafines de 75 nm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome Leica (Leica, Allemagne).

• Les images MET, acquises au centre de microscopie de Tours (R. Uzbekov, B. Arbeille) ont été analysées grâce à un logiciel maison : ChocINSERM.
Celui-ci permet :

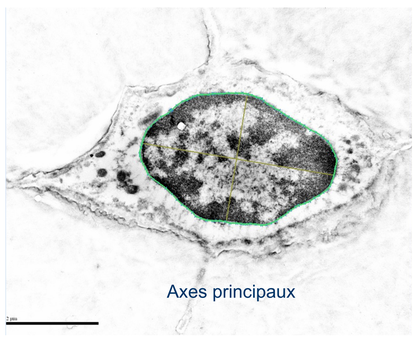
- la visualisation des images et de "zoomer",
- la réalisation d'une analyse qualitative (série de critères biologiques, l'utilisateur répond par oui ou par non)
- la prise de mesures linéaire ou surfaciques,



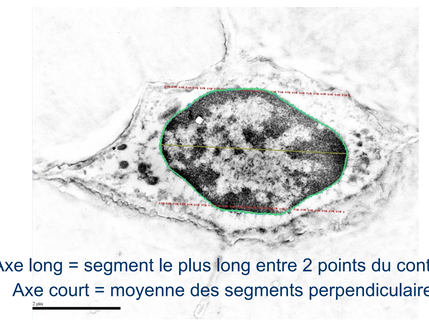
- le calcul automatique des axes de l'objet étudié à partir du tracé du contour de cet objet,



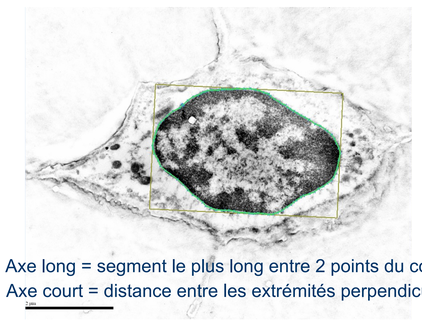
Axes le plus long et le plus court passant par le centre



Axes principaux



Axe long = segment le plus long entre 2 points du contour
Axe court = moyenne des segments perpendiculaires



Axe long = segment le plus long entre 2 points du contour
Axe court = distance entre les extrémités perpendiculaires

- la sauvegarde automatique de tous les résultats ainsi que leur export dans un fichier excel.

Paramètres dérivés

A partir des mesures "primaires" (longueurs des axes, surfaces), on calcule des paramètres "secondaires" :

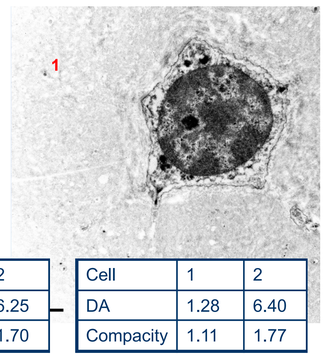
Le degré d'anisotropie :

$$DA = \frac{\text{Longest axis}}{\text{Shortest axis}} \geq 1$$

L'indice de compacité :

$$\text{Compacity} = \frac{\text{Perimeter}}{2 \times \sqrt{\pi \times \text{Area}}} \geq 1$$

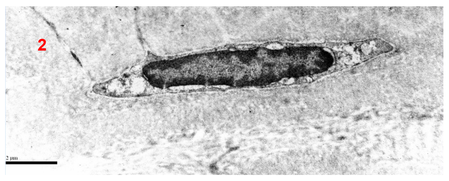
Exemples



Lacuna	1	2
DA	1.27	6.25
Compacity	1.12	1.70

–

Cell	1	2
DA	1.28	6.40
Compacity	1.11	1.77



Nucleus	1	2
DA	1.15	5.18
Compacity	1.00	1.54

	1	2
Surf(N/C)	71%	57%
Surf(C/L)	84%	86%

Analyse de notre base de données selon 14 paramètres

Analyse descriptive

Variable	Minimum	Maximum	Average	Std dev
Surface of the nucleus	1.358	15.362	7.056	2.886
Surface of the cell	3.959	49.595	14.788	7.374
Surface of the lacuna	5.867	68.629	18.405	9.394
Nucleus Center Long	1.781	7.712	4.166	1.094
Nucleus Center Short	0.896	4.149	2.060	0.691
Cell Center Long	3.091	12.994	6.732	1.918
Cell Center Short	1.298	5.759	2.824	0.927
Lacuna Center Long	3.835	13.752	7.311	2.085
Lacuna Center Short	1.466	6.938	3.233	0.984
Ratio Surf Nucleus / Surface cell	0.171	0.747	0.502	0.133
Ratio Surf cell / Surface lacuna	0.431	0.960	0.808	0.098
Compacity Nucleus	0.971	1.755	1.169	0.154
Compacity Cell	1.093	1.931	1.294	0.161
Compacity Lacuna	1.084	1.787	1.272	0.144

Variabilités Intra- & Inter- experts

2 évaluations par expert n°1
(séparées par 2 mois)
1 évaluation par expert n°2

Pour chaque mesure, on calcule l'indice :

$$\frac{Mes_1 - Mes_2}{(Mes_1 + Mes_2)/2}$$

Résultats :

Intra- Axes manuels : 3.2%
Axes automatiques : 2.4%
Surface : 2.7%

Inter - Axes manuels : 4.3%
Axes automatiques : 3.7%
Surface : 5.2%

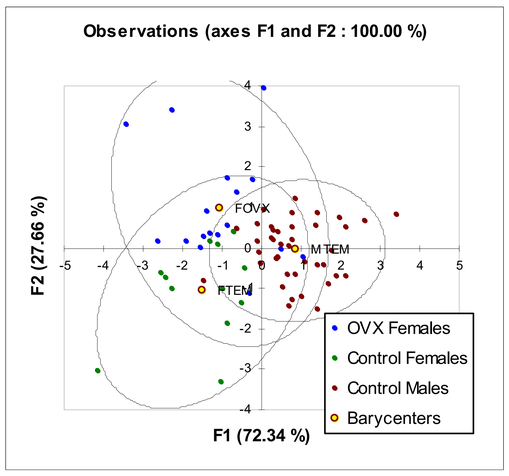
Analyse factorielle discriminante

Matrice de confusion

from \ to	OVX F	Control F	Control M	Total	% correct
OVX F	13	2	2	17	76.47%
Control F	3	9	0	12	75.00%
Control M	3	1	36	40	90.00%
Total	19	12	38	69	84.06%

Matrice de cross-validation

from \ to	OVX F	Control F	Control M	Total	% correct
OVX F	9	5	3	17	52.94%
Control F	3	6	3	12	50.00%
Control M	5	2	33	40	82.50%
Total	17	13	39	69	69.57%



Conclusion

• L'analyse factorielle discriminante est capable de classer 84% de la population. La séparation femelles ovariectomisées vs femelles contrôles plus difficile que celle femelles vs males (ROC AUC = 0.92)

• L'utilisation du logiciel ChocINSERM a permi l'analyse des images MET des ostéocytes. Il pourrait être appliqué sur d'autres modalités 2D. Ses limites sont connues et présentent des variabilités inter- et intra- experts relativement faibles.

http://sourcesup.cru.fr/projects/chocinserm/