

A. SKALLI

C. CIBERT

D. SCHOEVAËRT

**Discrimination morphologique de cultures de fibroblastes FR.3T3 normaux et transformés par le virus polyome**

*Les cahiers de l'analyse des données*, tome 12, n° 1 (1987), p. 7-32

[http://www.numdam.org/item?id=CAD\\_1987\\_\\_12\\_1\\_7\\_0](http://www.numdam.org/item?id=CAD_1987__12_1_7_0)

© Les cahiers de l'analyse des données, Dunod, 1987, tous droits réservés.

L'accès aux archives de la revue « Les cahiers de l'analyse des données » implique l'accord avec les conditions générales d'utilisation (<http://www.numdam.org/conditions>). Toute utilisation commerciale ou impression systématique est constitutive d'une infraction pénale. Toute copie ou impression de ce fichier doit contenir la présente mention de copyright.

NUMDAM

Article numérisé dans le cadre du programme  
Numérisation de documents anciens mathématiques  
<http://www.numdam.org/>

# **DISCRIMINATION MORPHOLOGIQUE DE CULTURES DE FIBROBLASTES FR.3T3 NORMAUX ET TRANSFORMES PAR LE VIRUS POLYOME [DISC.MORPH.CELL.]**

A. SKALLI(1)  
C. CIBERT(2)  
D. SCHOEVAËRT(3)

## **1 Introduction : Observation et analyse de la morphologie cellulaire.**

**1.1 Les cellules animales ; schéma de leur organisation :** Quelle qu'en soit la diversité, les cellules animales, sont toutes construites sur le même schéma fondamental.

Elles sont enveloppées par une membrane, la membrane plasmique, surface d'échange, de perception et de contact.

Leur cytoplasme est très hétérogène. La matrice cytoplasmique est encore mal connue. Elle peut être assimilée à un gel plus ou moins tramé dans lequel se déroule de très nombreuses réactions métaboliques. Il est parcouru par un réseau très organisé et dynamique de microtubules et de microfilaments, le cytosquelette, entre les mailles duquel se trouvent le noyau et les organites [1].

Le noyau contient le patrimoine génétique des cellules sous forme de chromatine, constituée de protéines et d'acides nucléiques. Les organites sont de véritables compartiments intracellulaires, délimités chacun par une membrane. Seuls, en interaction les uns avec les autres et en association avec la matrice cellulaire et le cytosquelette, ils assurent de nombreuses fonctions métaboliques.

---

(1) Laboratoire de Statistique, Université Pierre et Marie Curie , 75252 Paris  
Ecole Mohammadia d'Ingenieurs B.P. 765 Rabat-Agdal

(2) Laboratoire d'Enzymologie, C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette  
Laboratoire d'Histo-embryologie, Hôpital du Kremlin-Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre

(3) Unité de Morphomatique, Hôpital du Kremlin-Bicêtre 94270 Le Kremlin-Bicêtre

Du fait de leur complexité ultrastructurale et métabolique, l'étude des cellules animales *in vivo* est très difficile. C'est pourquoi des techniques de culture cellulaire ont été développées pour permettre un accès expérimental à certaines de leurs propriétés.

**1.2 Les cellules en culture : leur morphologie:** Les cellules en culture (fibroblastes par exemple) qui se développent à la surface d'un support solide plan (verre ou plastique) dans un milieu leur assurant une croissance convenable, présentent une grande diversité de formes. Certaines cellules sont rondes (cellules en division), mais la plupart d'entre elles sont bipolaires ou multipolaires et leur contour est plus ou moins régulier. Pour l'observateur averti, l'ensemble des cellules d'une même souche, cultivées dans des conditions données, présentent une "morphologie d'ensemble" (distribution des formes autour d'une forme caractéristique) qui peut cependant être modifiée par l'action de certains stimuli physiques, chimiques et biologiques [2].

Dès 1978, on a noté une corrélation très étroite entre la morphologie des cellules en culture, leur affinité pour le support sur lequel elles sont fixées et leur métabolisme [2]. Depuis, ces observations ont été confirmées par de nombreux auteurs pour lesquels la morphologie cellulaire est un paramètre fondamental, caractéristique de l'état physiologique des cellules en culture.

D'un point de vue dynamique, toutes les cellules en culture se déforment plus ou moins rapidement [3]. Les cellules présentent en effet, deux types de motilité : la motilité stationnaire, et la motilité de translation. Sous le terme de motilité stationnaire on classe les rétractions et les extensions du cytoplasme des cellules, ainsi que les ondes qui les parcourent. En général, les cellules qui présentent ce type de motilité ne sont pas polarisées. Le terme de motilité de translation traduit un déplacement important des cellules qui acquièrent alors une forme polarisée caractéristique [3]. En règle générale, les cellules qui se déplacent émettent des voiles cytoplasmiques plus ou moins étendus dans leur partie antérieure, alors que leur partie postérieure présente de fins prolongements.

L'étude microcinématographique des cellules en culture montre que certaines cellules non polarisées peuvent cependant se déplacer sur leur support, à de faibles vitesses, en envoyant des voiles cytoplasmiques réduits. On parlera alors de glissements cellulaires. Ce type de mouvement semble être le plus fréquemment observé *in vivo*.

*In vitro*, il existe un équilibre entre ces trois types de motilités, qu'une même cellule peut adopter au cours de son cycle de développement. On ne connaît pas les mécanismes qui président au "choix" par la cellule de l'un ou de l'autre de ces 3 types de mouvements.

La transition entre la motilité stationnaire et la motilité de translation peut être observée *in vitro* dans certaines conditions, lorsque les cellules sont soumises à des stimuli particuliers. Ce phénomène est connu sous le nom de chémoattraction, composante essentielle du mécanisme de défense de l'organisme contre certains antigènes figurés ou solubles [4].

En l'absence de modification des conditions de culture, la morphologie d'ensemble de la population cellulaire est conservée alors que la forme de chacune des cellules varie constamment.

Il est maintenant démontré que le cytosquelette (cf. supra), en association avec la membrane plasmique des cellules (et les protéines qui lui sont associées) joue un rôle essentiel dans la morphogénèse cellulaire, tant *in vitro*, qu'*in vivo* [5].

Sans entrer dans les détails, la quantification de la morphologie cellulaire permet de connaître l'état physiologique d'une culture cellulaire, ainsi que la conformation, et éventuellement l'état fonctionnel du cytosquelette et des membranes cellulaires.

**1.3 Les méthodes de quantification de la morphologie des cellules en culture:** L'avènement des techniques d'analyse d'images a permis un développement important des essais de quantification de la morphologie cellulaire.

Les premières méthodes proposées dans la littérature, reposaient essentiellement sur la détermination de paramètres "simples" (surface, périmètre par exemple) de tout ou partie du cytoplasme des cellules, après fixation et coloration [6]. Ces techniques sont d'un grand intérêt clinique puisqu'elles peuvent être utilisées pour quantifier les morphologies des cellules observées sur des coupes ou des frottis colorés. Mais elles ne prennent en compte ni les caractéristiques locales du tracé du contour cellulaire, ni les données morphométriques contenues dans l'aspect (ou texture) du cytoplasme ou du noyau.

Si les méthodes d'étude des textures sont encore balbutiantes et ne peuvent être facilement mises en oeuvre, la quantification de la forme du tracé du contour cellulaire peut être réalisée, soit à l'aide des méthodes connues sous le nom générique de morphologie mathématique, soit comme nous l'avons fait, après segmentation du contour cellulaire en éléments simples [7].

**1.4 Principe de l'approche morphométrique utilisée; intérêt de l'analyse des données:** Nous avons proposé une méthode de quantification de la morphologie des cellules en culture observées directement dans les flacons de culture sans coloration préalable [7]. Nous avons utilisé les fibroblastes FR.3T3 comme modèle expérimental. Ces cellules sont très faciles à maintenir en culture, leur morphologie présente des caractéristiques qui se prêtent bien à l'analyse et enfin, il existe de nombreuses données biochimiques et ultrastructurales relatives au mécanisme de leur fixation sur un support et à l'organisation de leur cytosquelette.

Cette méthode a été utilisée pour caractériser les différences morphologiques existant entre 156 fibroblastes FR.3T3 normaux et 156 cellules de la même souche transformées par le virus polyome.[7]

Les fibroblastes ont été photographiés à l'aide d'un microscope photonique à contraste de phase, 48 heures après leur ensemencement. Leur contour ont été ensuite analysés à l'aide d'un analyseur d'images (Quantimet 720, Cambridge Instrument) couplé à un ordinateur (PDP 11/34, Digital Equipment). Seules les cellules isolées sur le support (sans aucun contact avec d'autres cellules) ont été considérées.

La méthode d'analyse d'image que nous avons utilisée se déroule en deux étapes; nous dirons que les images des cellules sont d'abord vectorisées, puis leur contour sont polygonalisés.

La vectorisation consiste à réduire chaque cellule en une suite de vecteurs (ou traversées) dont on détermine les coordonnées cartésiennes des extrémités et les modules. Le contour cellulaire est alors l'ensemble des points, origines et extrémités de tous les vecteurs. Ceci permet d'échantillonner les points du contour cellulaire plus facilement que ne le ferait un algorithme qui les échantillonnerait à partir de l'image saisie directement par l'analyseur d'image.

La polygonalisation des contours cellulaires consiste à en déterminer les convexités et les concavités importantes. Compte tenu du grandissement des cellules observées ( $450 \mu$  correspondent à 503 pixels, la surface moyenne des cellules est environ de  $1000\mu^2$ ), ces points sont échantillonnés de telle sorte qu'ils soient au moins distants les uns des autres de 4 pixels, et que trois points échantillonnés successifs forment un angle d'au moins 0.2 radian (plus exactement cet angle est l'angle aigu dont tourne la direction du côté orienté). Les concavités et les convexités sont discriminées en fonction du signe de l'angle qui leur est associé, déterminé par rapport à un repère fixe, c'est-à-dire selon le signe de la courbure du contour.

La nécessité des deux contraintes d'angle et de distance que nous avons introduites dans l'algorithme de polygonalisation des contours a été démontrée expérimentalement. Elles ont pour but d'éviter l'échantillonnage des petites convexités et des petites concavités soit, que celles-ci apparaissent du fait de la discrétisation du contour cellulaire sur l'écran de l'analyseur d'image, que la signification biologique en soit cachée, compte tenu du niveau d'observation auquel nous sommes placés; les valeurs de 4 pixels, et 0,2 radians ont été choisies selon nos observations.

Nous avons défini une "expansion cytoplasmique" comme la portion du cytoplasme délimitée par le segment de contour cellulaire et la corde qui relie deux concavités successives.

Nous avons déterminés 15 paramètres morphologiques après polygonalisation du contour cellulaire et en particulier ceux que nous avons associés aux expansions cytoplasmiques (voir liste).

Ceci nous a permis de décrire à la fois la morphologie globale de chaque cellule, mais aussi certaines caractéristiques locales de leur contour.

Afin d'analyser l'ensemble des données fournies par la quantification proprement dite de la morphologie de chacune des cellules des deux échantillons des deux populations considérées, nous avons fait appel à l'analyse factorielle des correspondances et à l'analyse discriminante barycentrique [8], [10]. Le présent travail a pour objet de montrer la portée de la méthode statistique employée, et de donner les principaux résultats obtenus lors de cette étude [9].

L'intérêt de la méthode est de déterminer sans ambiguïté les formes cellulaires plus clairement que ne le permettent d'une part, l'observation visuelle non quantifiée et d'autre part la lecture d'un vaste tableau de mesure ; on peut alors non seulement caractériser les deux populations étudiées, mais encore reconnaître des sous-types au sein de chacune de celles-ci. Une telle méthode pourra être très utile pour l'étude de la déformation cellulaire, l'analyse de motilité ou les essais pharmacodynamiques.

#### LISTE DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES CALCULES PAR CELLULE ET LEURS IDENTIFICATEURS.

- Surface de la Cellule : SUC
- PERimètre : PER
- Grand AXe : GAX
- Facteur de FOrme : FFO(a)
- ExCentricité : ECC(b)
- Nombre des EXpansions cytoplasmiques : NEX
- Somme de surfaces des EXpansions cytoplasmiques : SEX
- Surface Moyenne des Expansions cytoplasmiques : SME
- Ecart type de la Surface des Expansions cytoplasmiques (c) : ESE
- ECHinicité de la cellule (d) : ECH
- Somme des Longueurs des Expansions cytoplasmiques (e) : SLE
- Ecart type des Longueurs des Expansions cytoplasmiques (f) : ELE
- R MoYen (g) : RMY
- Ecart Type de R : ETR
- Polarité cellulaire (h) : VEC

#### COMMENTAIRES

(a) :  $FFO = PER^2 / 4 \times SUC$

(b) :  $ECC = GAX^2 / 4 \times SUC$

(c) : l'écart type de la surface des expansions cytoplasmiques rend compte de leur variabilité pour une cellule donnée.

(d) : l'échinicité est égale au rapport entre la somme des surfaces des expansions cytoplasmiques et la surface totale de la cellule. Ce paramètre met en évidence la proportion du cytoplasme de la cellule qui est impliquée dans la constitution des expansions cytoplasmiques.

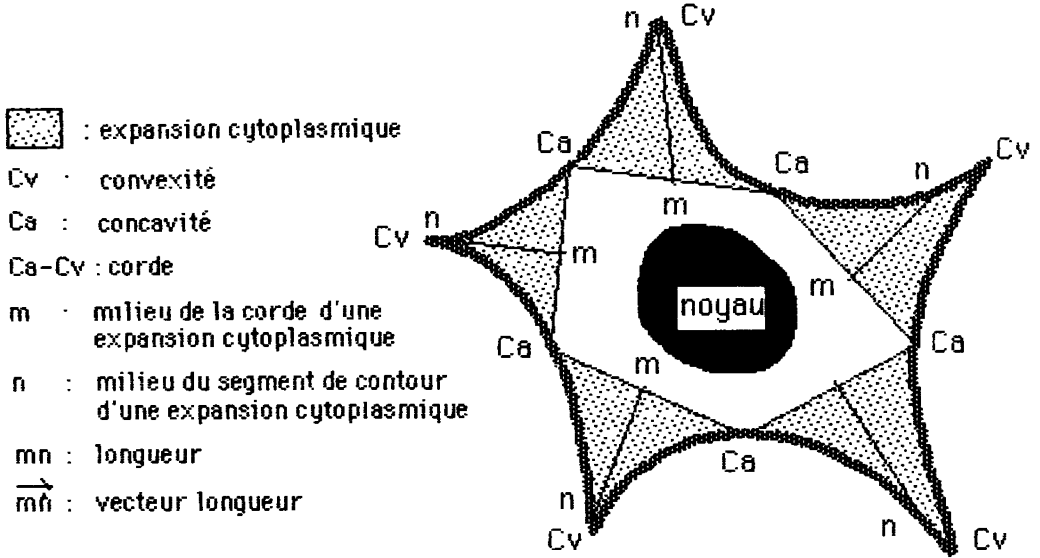
(e) : la "longueur" d'une expansion cytoplasmique est égale à la longueur du segment qui relie le milieu du segment de contour et la corde qui la définissent (figure1).

(f) : l'écart type des longueurs des expansions cytoplasmiques rend compte de leur variabilité.

(g) : R est égal au rapport entre la "longueur" et la corde qui définissent une expansion cytoplasmique. L'écart type de R rend compte de la variabilité des expansions cytoplasmiques d'une cellule.

(h) : la polarité cellulaire est égale à la somme vectorielle des vecteurs longueurs des expansions cytoplasmiques. Chaque vecteur longueur est orienté du centre vers la périphérie de la cellule (figure 1).

Figure 1 : Schéma d'une cellule avec les éléments de définition des paramètres



## 2 Des méthodes utilisées aux tableaux analysés:

**2.1 Analyse factorielle et discrimination barycentrique.** En analyse discriminante, on cherche à placer une cloison entre deux classes connues a priori, constituant une partition d'un ensemble ; le but de la discrimination est de pouvoir ultérieurement affecter tout nouvel individu à l'une des deux classes et cela avec la meilleure garantie de réussite possible. Or, cette partition présumée peut ne pas être hiérarchiquement la plus importante. Nous pensons qu'une étude préalable et affranchie de toute hypothèse est à la fois plus riche et plus sûre. En abordant les données, sans mêler à leur analyse ce qu'on présume de la structure, on peut éventuellement mettre en évidence un ordre insoupçonné; et si d'autre part les résultats sont conformes à ce qu'on en attendait, l'hypothèse est à la fois confirmée et précisée. Une fois cette étude réalisée, l'analyse discriminante devient très utile et prend un intérêt pratique.

Voilà pourquoi l'analyse morphologique des cellules a nécessité l'utilisation de deux méthodes: l'analyse factorielle des correspondances et l'analyse discriminante barycentrique. La première a permis de reconnaître deux tendances de forme principales; les cellules à contour lisse et multipolaires, qui apparaissent dans les deux populations, présentant des caractéristiques différentes. Les cellules à contour lisse des deux populations ont été regroupées dans le même tableau et séparées des cellules multipolaires. Dans chacun des cas, la caractérisation des cellules normales (N.3T3) et

des cellules transformées (Py.3T3) a été réalisée à l'aide de l'analyse discriminante barycentrique. Présentement l'objet de cette méthode d'analyse est de séparer l'ensemble des cellules en deux sous ensembles N.3T3 et Py.3T3.

A cette fin on a constitué un tableau de deux lignes N et P relatives respectivement aux cellules normales et transformées. Chacune de ces lignes est le cumul décrivant les cellules qui la composent. Les cellules elles-mêmes sont juxtaposées au tableau en lignes supplémentaires. De l'analyse factorielle des correspondances de ce tableau à deux lignes principales résulte un axe unique passant par les deux points représentant les deux classes N et P; Ces 2 classes, sont à un facteur près, les 2 barycentres des deux sous-ensembles de cellules. Ceci justifie le terme "barycentrique" dans le nom de la méthode.

La droite qui joint les 2 centres de gravité N et P est l'axe barycentrique. Sur cette droite on projette de part et d'autre les cellules des deux populations considérées comme des lignes supplémentaires. La coordonnée de chaque cellule sur cet axe est son unique facteur. On peut projeter également les modalités de variables sur la même droite.

La discrimination se fait alors sur cet axe barycentrique en fixant un point de séparation entre les deux demi-droites d'affectation à chacune des deux classes. La séparation est déterminée le plus simplement par l'origine de l'axe factoriel. Cependant, si ces deux classes ne résultent pas de deux ensembles de même cardinal, elles sont pondérées avant de faire l'analyse pour compenser ce déséquilibre. L'origine des axes est alors le milieu du segment joignant les deux centres de gravité N et P.

## **2.2 Tableaux analysés : découpage des variables pour tous les tableaux.**

**2.2.1. Tableau de l'union des deux populations :** On considère l'ensemble des deux populations composé de 156 cellules normales (N.3T3) et de 156 cellules transformées par le virus polyome (Py.3T3) . Les 15 paramètres (cf. § 1.2) seront découpés en cinq modalités chacun. Un tableau logique en (0,1) de 312 lignes (cellules) et 75 colonnes (modalités) sera soumis à l'analyse factorielle des correspondances. Les lignes seront identifiées par une lettre N ou P selon qu'il s'agit d'une cellule Normale ou transformée par le virus Polyome. Les colonnes seront reconnues par un sigle composé de trois lettres, rappelant les paramètres, suivi d'un chiffre 1 à 5 indiquant le rang de la modalité.

**2.2.2. Tableaux des cellules à contour lisse des deux populations:** L'analyse du tableau précédent et décrite dans le § 3.1.1 a mis en évidence une partition de l'ensemble des deux souches composée de deux groupes. Les cellules de morphologie simple à contour lisse ou cellules rondes et les cellules de morphologie complexe dont le contour est étoilé qu'on appellera "cellules multipolaires".

Le premier groupe se compose de 107 cellules. L'analyse a montré que seuls cinq paramètres varient à l'intérieur de ce groupe, les autres restant constants. Ces cinq paramètres seront découpés en quatre modalités chacun. Un tableau (107 x 20) sera étudié par l'analyse factorielle des correspondances (cf. § 3.1.2.) et par l'analyse discriminante barycentrique (cf. § 3.2.2.).



### 2.2.3. Tableaux des cellules multipolaires des 2 populations :

L'analyse du tableau de l'union des deux populations décrite dans le § 3.1.1 a mis en évidence un deuxième groupe composé de 203 cellules multipolaires, chacune décrite par les quinze paramètres morphologiques. Ces derniers seront éclatés en quatre modalités chacun des plus petites valeurs (modalités 1) aux plus grandes (modalités 4). Un tableau de 203 x 60 sera étudié par l'analyse factorielle des correspondances (cf § 3.1.3.) et par l'analyse discriminante barycentrique (cf § 3.2.3.).

Comme précédemment les points figuratifs des lignes (cellules) seront identifiées sur les graphiques par N ou par P.

## 3 Résultats.

### 3.1 Analyses factorielles :

**3.1.1. Analyse de l'union des deux populations :** Sur les figures 3 et 2 on trouve les projections respectives des 312 cellules et des 75 modalités qui les caractérisent sur le même plan factoriel (1,2). L'observation de la figure 2 montre deux résultats importants:

- l'axe 1 oppose deux groupes de cellules d'une manière très nette ; le premier plus important en nombre et plus dispersé, situé du côté  $F1 < 0$  est, composé à la fois de cellules normales et de cellules transformées par le virus polyome ; le deuxième, situé du côté  $F1 > 0$ , est plus petit et beaucoup plus homogène, mais composé également de cellules normales et de cellules transformées par le virus polyome.

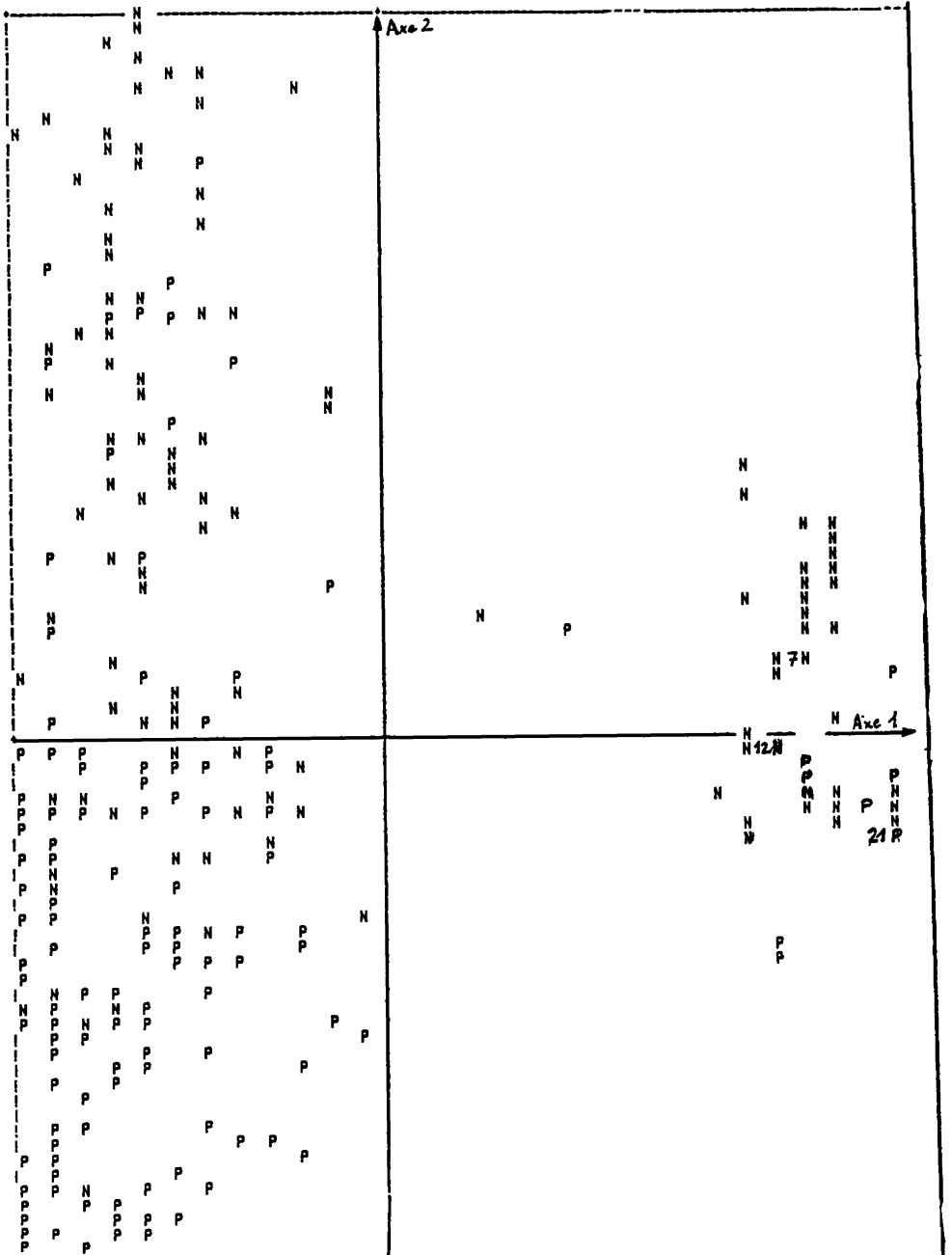
- l'axe 2 oppose d'une manière beaucoup moins nette une majorité de cellules normales ( $F2 > 0$ ) à une majorité de cellules transformées par le virus ( $F2 < 0$ ). Pour bien caractériser ces groupes de cellules il suffit de se reporter sur la figure 3. Les 5 modalités de quelques variables importantes ont été reliées par des lignes brisées. Pour les 8 variables (SEX, SME, ESE, SLE, ELE, RMY, ETR, VEC) on obtient des lignes d'allure comparable. En effet la modalité 1 est toujours située du côté  $F1 > 0$  et les modalités de 2 à 5 s'échelonnent dans l'ordre sur l'axe 2. Sur le plan des modalités ont été définies cinq régions. Les modalités des sept autres variables se disposent différemment :

- a) Celles de la variable "Grand Axe" (GAX), tout en décrivant grossièrement la même courbe que les 8 variables précédentes, occupe une région plus petite dans le plan (1,2). La corrélation de ses modalités 2 à 5 est moins nette avec les modalités de même rang des 8 premières variables.

- b) Les modalités de la Surface de la Cellule (SUC) et du PERimètre (PER), s'étalant peu sur l'axe 2, sont caractéristiques de l'axe 1.



Figure 3 : Projection sur le même plan(1,2) des 312 cellules. (cf. 3.1.1)  
 N: cellules Normales; P: cellules transformées par le virus polyome.  
 Certaines cellules superposées en un seul point sont représentées par une lettre (N ou P) précédée de leur nombre.



c) Le Nombre d'EXpansions cytoplasmiques (NEX), tout en ayant sa modalité 1 dans la région 1, a ses modalités 2 à 5 qui s'échelonnent dans l'ordre décroissant sur l'axe deux.

d) La première modalité du paramètre Facteur de FOrme (FFO) est située dans la région 1. Quant aux autres de ses modalités, en particulier les modalités 2 et 4, proches de l'origine des deux axes factoriels, elles sont peu corrélées à la répartition des autres variables.

e) La modalité 5 de l'ECHinicité (ECH) se trouve dans la région 1, tandis que les autres sont du côté  $F2 < 0$ .

f) L'ExCentricité (ECC), seule variable qui n'a pas de modalités dans la région 1, caractérise bien l'axe 2.

En superposant les figures 2 et 3, on observe l'opposition nette sur l'axe 1 entre 107 cellules de forme simple et régulière et 203 cellules de formes plus complexes. Les paramètres (PER, SUC, GAX, ECC et FFO) des cellules localisées dans la région 1 sont variables. Les dix autres paramètres qui leur sont associés, sont nuls ou constants. On trouve dans la région 1 des cellules appartenant aux deux populations qui avec un Nombre d'EXpansions cytoplasmiques et un rayon  $R_{MoYen}$  nul, ont une forme ronde. On peut expliquer leur faible dispersion sur le plan par une homogénéité due à l'invariabilité de 10 paramètres. Leur analyse avec les seuls paramètres variables pourra toutefois mettre en évidence des formes particulières (cf. § 3.1.2.).

Les cellules, correspondant aux régions 2, 3, 4, 5, plus dispersées le long de l'axe 2 et donc moins homogènes que celles de la région 1 sont bipolaires ou multipolaires. Du côté  $F2 < 0$  on trouve une majorité de cellules transformées par le virus polyome, caractérisée par une petite surface totale d'expansion cytoplasmiques SEX2 un grand nombre d'expansions cytoplasmiques (NEX4, NEX5) une ECHinicité faible (ECH1, ECH2, ECH3), donc une proportion de cytoplasme impliqué dans l'expansion cytoplasmique faible par rapport à la surface totale de la cellule. Ce sont des cellules à contour très irrégulier et très étoilé. Pour ces cellules les écarts-types des surfaces des expansions cytoplasmiques (ESE2) des longueurs des expansions cytoplasmiques (ELE2, ELE3) et des  $R_{Moyens}$  (ETR2, ETR3) sont faibles, ce qui atteste d'une similitude entre les expansions cytoplasmiques. Leur faible excentricité les rapproche des cellules à contour lisse. Elles ont donc une forme globale à peu près circulaire tout en présentant beaucoup d'expansions cytoplasmiques. Du côté  $F2 > 0$  on trouvera une majorité de cellules normales, caractérisée par une grande surface totale d'expansions cytoplasmiques (SEX5), avec deux expansions cytoplasmiques seulement. Leurs écarts-types caractéristiques des expansions cytoplasmiques sont forts (ESE5, ELE5, ETR5). Leur excentricité est généralement forte. Ce sont des cellules souvent bipolaires et très allongées.

En conclusion, l'analyse de l'union de ces deux populations (N.3T3 et Py.3T3) met en évidence deux groupes de cellules indépendants des souches de départ puisque chacun contient des cellules normales et polyomes. Le premier groupe composé de 72 cellules normales et de 35 cellules transformées représentant le tiers environ de l'union des deux échantillons (107/312), contient des cellules de forme ronde et à contour

Figure 4 : Projection sur le plan(1,2) des 20 modalités de variable. (cf. § 3.1.2).

Pour la légende des sigles, voir liste des paramètres.

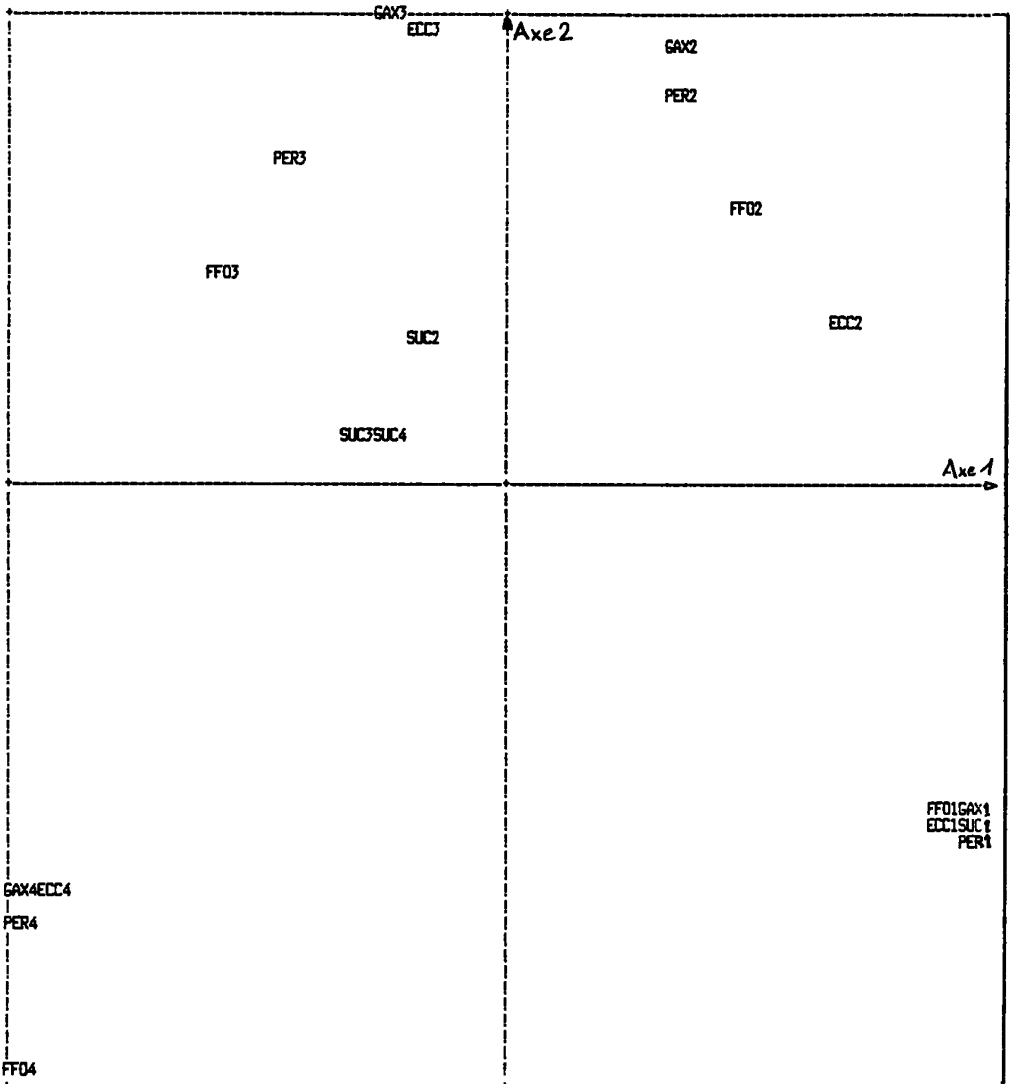


Figure 5 : Projection sur le plan(1,2) des 107 cellules rondes. (cf. §3.1.2)

NUM	ITER	VAL PROPRE	POURCENT	CUMUL	HISTOGRAMME DES VALEURS PROPRES DE LA MATRICE
2	1	0.75528	24.995	24.995	!.....!.....!.....!.....!.....
3	1	0.53851	17.822	42.817	!.....!.....!.....!.....!.....
4	2	0.42137	13.945	56.762	!.....!.....!.....!.....!.....
5	2	0.29914	9.900	66.662	!.....!.....!.....!.....!.....
6	1	0.21860	7.235	73.896	!.....!.....!.....!.....!.....
7	2	0.18634	6.167	80.063	!.....!.....!.....!.....!.....
8	2	0.16654	5.511	85.575	!.....!.....!.....!.....!.....
9	2	0.12135	4.016	89.591	!.....!.....!.....!.....!.....

AXE HORIZONTAL (1)—AXE VERTICAL (2)—TITRE: AFC DES CELLULES RONDES  
 NOMBRE DE POINTS : 107

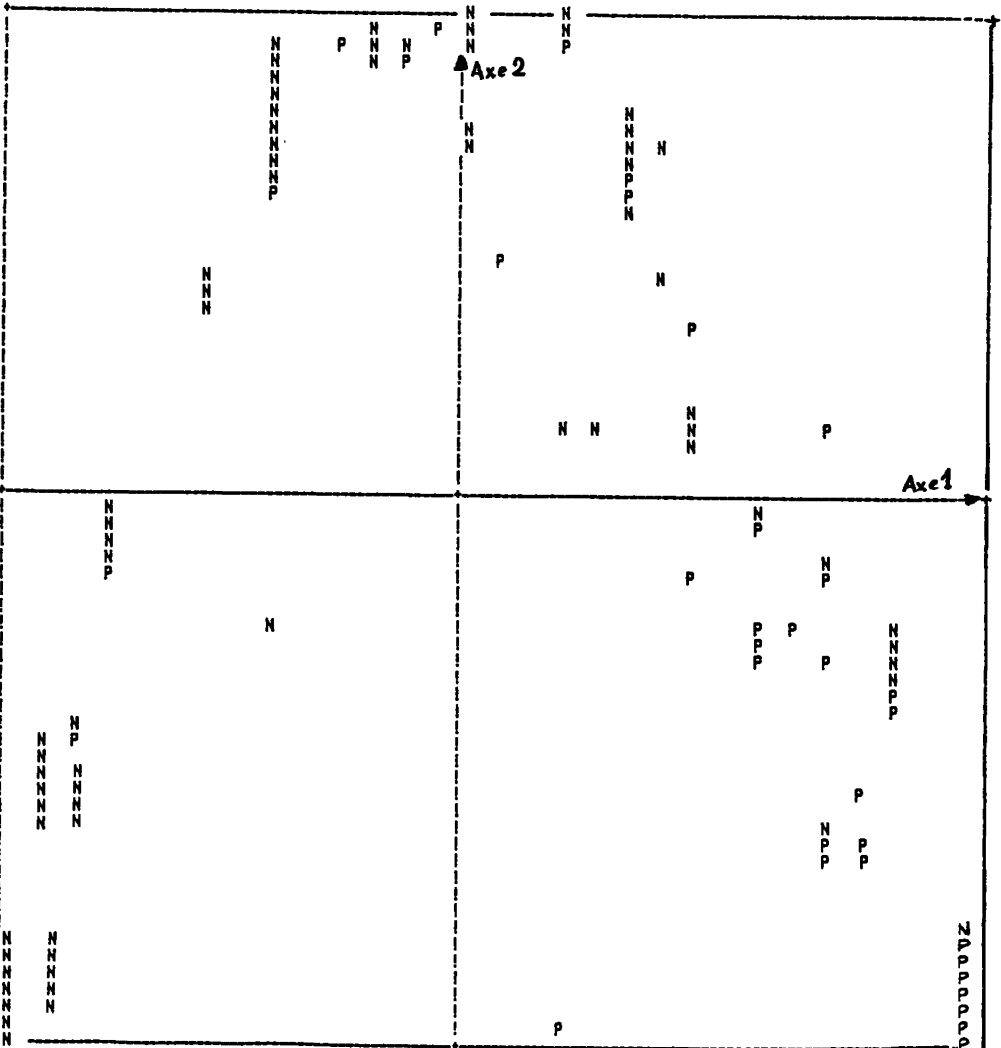


Figure 6 : Projection sur le plan(1,2) des 60 modalités de variable. (cf. § 3.1.3 )  
Pour la légende des sigles voir liste des paramètres p. 11

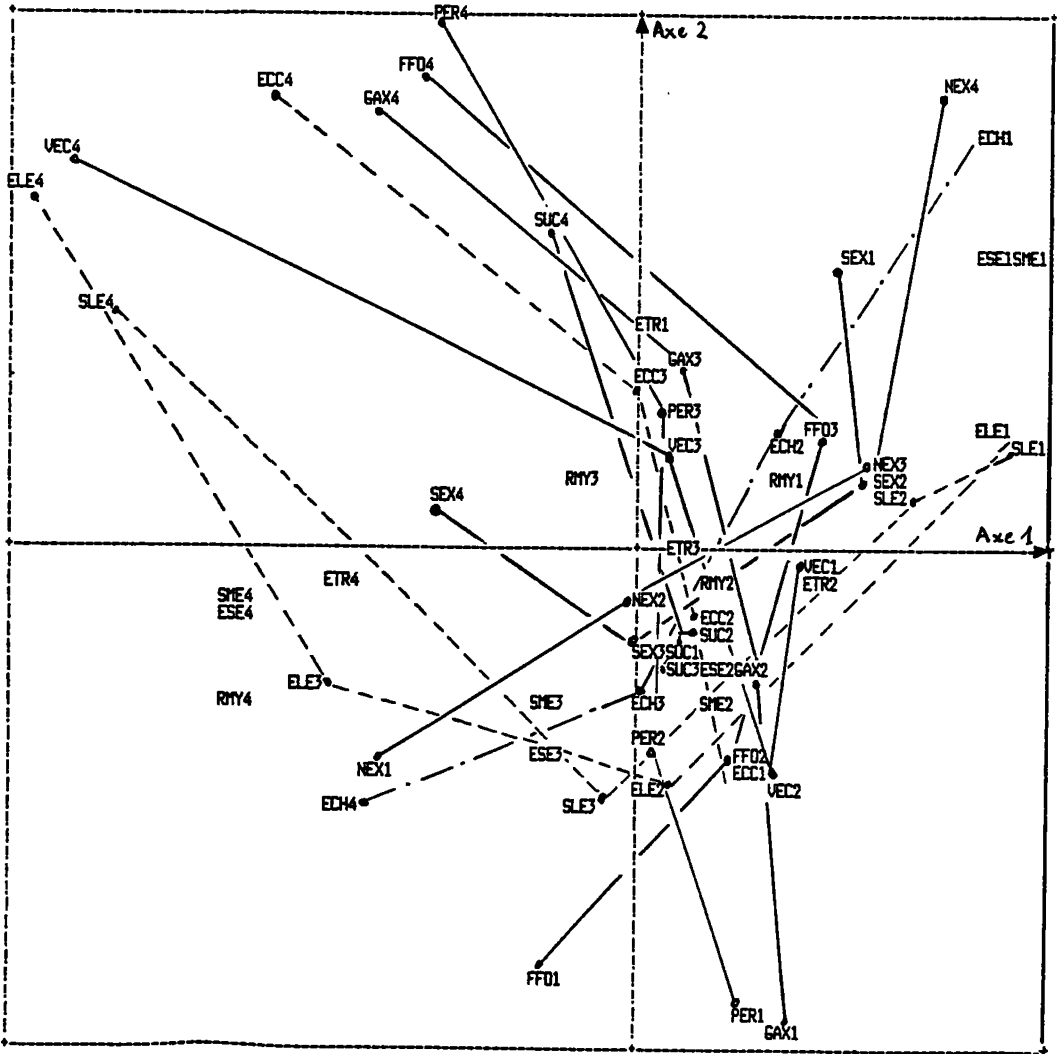
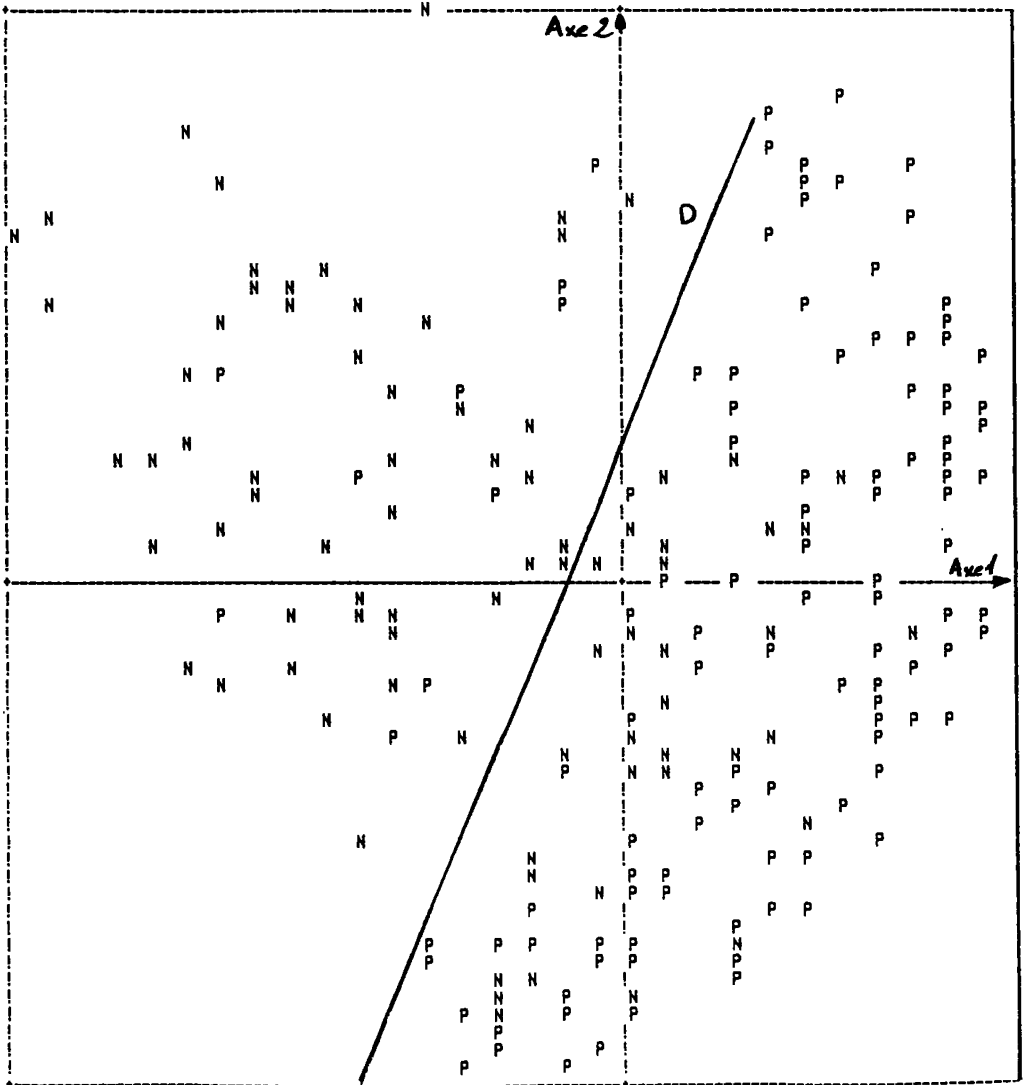


Figure 7 : Projection des 203 cellules multipolaires ( cf § 3.1.3)

Pour la légende des sigles voir liste page 11. Une droite D représente la séparation entre les cellules normales et les cellules transformées par le virus polyome.





lisse. Le deuxième groupe composé de 82 cellules normales et de 121 cellules de l'autre souche représente les deux tiers environ de l'union des deux échantillons (203/312) et contient des cellules de forme irrégulière et de contour multipolaire. On peut donc remarquer que les cellules transformées par le virus polyome sont plus souvent de contour multipolaire et de forme plus irrégulière (121 contre 82) alors que les cellules normales sont plus souvent à contour lisse (72 contre 35).

**3.1.2. Analyse factorielle de l'ensemble des cellules à contour lisse:** On analyse ici le tableau 107x20 (cf. § 2.2.2.) qui correspond à la restriction de l'ensemble des 312 cellules de l'union des deux échantillons, aux 107 cellules à contour lisse qu'ils contiennent, et à la restriction de l'ensemble des paramètres calculés, à celui des 5 paramètres variables caractéristiques de cette sous-population (cf. § 3.3.1.) éclatés chacun en 4 modalités.

Les valeurs propres très élevées attestent des différences réelles malgré leur forme ronde et le contour lisse des cellules.

Ce résultat a pu être obtenu en se restreignant aux seuls paramètres variables dans cet ensemble de cellules rondes.

Les figures 4 et 3 montrent les projections respectives des cellules à contour lisse et les modalités de leurs variables. On observe un effet Guttman parfait ; ce qui atteste une corrélation nette entre les 5 variables considérées. Les modalités s'échelonnent des plus petites valeurs aux plus grandes en parcourant la parabole d'une corne ( $F1 > 0$  ;  $F2 > 0$ ) à l'autre ( $F1 < 0$  ;  $F2 < 0$ ).

Les deux tiers des cellules transformées par le virus polyome (P) sont situés dans le quadrant ( $F1 > 0$  ;  $F2 < 0$ ) et se caractérisent par les valeurs les plus faibles des cinq paramètres.

Une majorité de cellules normales (64/72) est répartie sur les trois autres quadrants avec une proportion de cellules normales augmentant au fur et à mesure qu'on se déplace vers la corne de la parabole ( $F1 < 0$  ;  $F2 < 0$ ). Les cellules normales ont des surfaces plus grandes et sont plus allongées que les cellules transformées. En anticipant sur le § 3.2.2 on peut imaginer une droite cloison entre les 2 populations qui serait la première bissectrice.

**3.1.3 Analyse factorielle des cellules multipolaires :** Le tableau 203x60 considéré ici croise les 203 cellules multipolaires avec les 15 paramètres éclatés chacun en 4 modalités.

Les figures 6 et 7 représentent les projections sur le plan (1,2) respectivement des modalités de variable et des cellules multipolaires.

Notons que la majorité des cellules Normales (N) ont un facteur  $F1 < 0$ , tandis que les cellules transformées par le virus Polyome (P) ont un facteur  $F1 > 0$  (cf. Fig.6).

Une cloison figurée par une droite D partage le plan (1,2) en séparant les cellules N et P plus nettement qu'on n'a pu le faire au § 3.1.2. En se reportant à la figure 7 on observe que les valeurs des paramètres sont presque toutes très grandes pour les

cellules normales à l'exception du nombre d'expansion cytoplasmiques (NEX). Ces résultats confirment et précisent ceux du § 3.1.1.

**3.2 Analyse discriminante barycentrique :** Dans tout ce qui suit, les 3 tableaux analysés précédemment seront repris par l'analyse discriminante barycentrique qui étudie le problème différemment. Ainsi que nous l'avons annoncé ci-dessus, on part du tableau de correspondance  $kIJ$ . L'ensemble  $I$ , ou ensemble des cellules est partagé en deux classes d'intersection vide,  $IN$  et  $IP$ , classes des cellules respectivement normales et transformées. A partir de  $kIJ$  on construit un tableau à deux lignes  $kCJ$  avec  $C = \{N,P\}$  et

$$k(N,j) = \sum \{k(i,j) \mid i \in IN\} ; \quad k(P,j) = \sum \{k(i,j) \mid i \in IP\}$$

Ces valeurs sont divisées, pour tout  $j$ , respectivement par le cardinal de  $IN$  et  $IP$  de telle sorte que  $k(N)$  et  $k(P)$  (totaux des deux lignes) soient égaux. Ces deux classes déterminent dans l'espace  $RJ$  deux points  $N$  et  $P$ . Sur la droite  $NP$ , on projette orthogonalement chacune des cellules, ce qui revient à les placer (à une homothétie près) au centre de gravité des modalités qu'elle possède.

Cette représentation unidimensionnelle est obtenue à l'aide de calculs simples [10]. La pondération effectuée permet d'avoir l'origine  $O$  au milieu des deux barycentres  $N$  et  $P$  (la cloison optimale étant précisément en  $O$ ).

**3.2.1 Analyse discriminante de l'union des deux populations :** Le tableau principal est le tableau  $\{N,P\} \times J$  ( $2 \times 75$ ) dont chacune des deux lignes (de même poids) donne le profil d'une population totale (Normale ou Polyome). Les 312 cellules individuelles, projetées en supplémentaire sont elles-mêmes représentées par les lettres  $N$  ou  $P$ . Si les deux populations de cellules normales et transformées sont différentes elles seront chacune situées de part et d'autre de l'origine. Dans le cas contraire on observera un recouvrement partiel, ou total, des deux échantillons. Ce recouvrement sera interprété comme une discrimination floue et traduit par un taux d'homologie entre les deux populations.

La répartition sur l'axe des cellules des deux populations figurée par un histogramme double donne :

	F > 0	F < 0
Cellules Normales	127	29
Cellules Polyomes	46	110

Figure 8 : Projection sur l'axe barycentrique des 75 modalités de variable associées à l'union des deux populations de cellules.

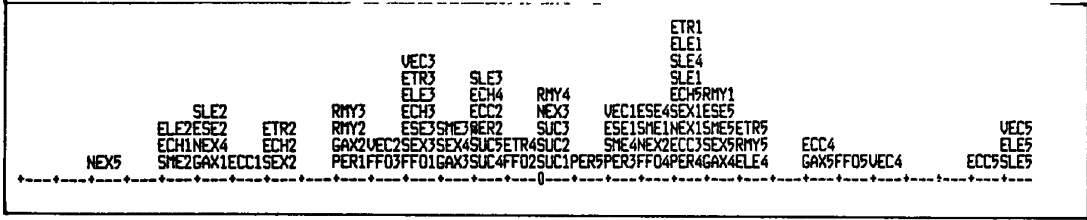
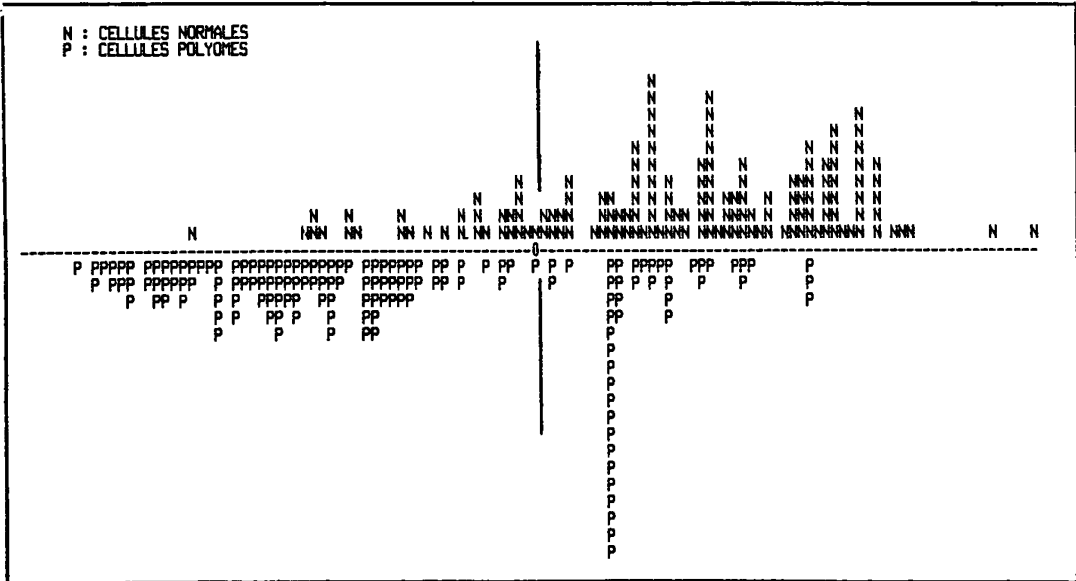


Figure 9 : Projection sur l'axe barycentrique en histogramme double des 312 cellules. Dans le but d'une lecture plus simple de cet histogramme, les cellules Normales ( N ) et transformées par le virus Polyome ( P ) sont projetées de part et d'autre de cet axe. Le point de séparation ou cloison sur celui-ci est matérialisé au milieu par le point 0. Une majorité de cellules Normales ( 81.5 % ) est projetée à droite alors que 70.5 % des cellules transformées par le virus Polyome est à gauche.



Le pourcentage de cellules normales du côté positif de l'axe est 81.5% alors que celui des cellules polyomes du côté négatif est 70.5% soit en moyenne un taux d'homologie de 24%. Les cellules normales se regroupent mieux que les cellules polyomes dont 29.5% se confondent avec les premières.

La répartition, sur le même axe, des modalités est très régulière puisque leur rang augmente dans le sens de l'axe sauf le nombre d'expansions cytoplasmiques (NEX) qui diminue.

Les cellules normales ont donc généralement des valeurs fortes de toutes les variables excepté le NEX.

Les taux d'erreur d'affectation de 24% et 29.5% constatés respectivement pour les échantillons de cellules normales et de cellules transformées, sont relativement élevés. Ceci peut être expliqué par leur constitution en cellules à contour lisse et en cellules à contour multipolaire, partition qui semble dominante par rapport au fait que les cellules sont soit normales soit transformées (cf. §3.1.1.).

La discrimination barycentrique entre cellules normales et cellules transformées au sein de chacune des deux sous-populations de cellules à contour lisse et de cellules à contour multipolaire, échantillonnées parmi l'union des deux échantillons sera donc plus nette que la discrimination précédente.

**3.2.2 Analyse discriminante des cellules à contour lisse :** Le tableau principal est ici (2x20) où la première ligne donne le profil moyen de toutes les cellules normales et à contour lisse et la deuxième ligne celui des cellules polyomes et à contour lisse. Les 20 modalités proviennent de l'éclatement, en 4 classes, des cinq paramètres variant sur les cellules à contour lisse. Les 72 cellules normales sont projetées d'un côté de l'axe barycentrique, les 35 cellules polyomes sont projetées de l'autre côté de l'axe.

L'histogramme double donne la répartition des deux catégories de cellules à contour lisse sur l'axe unique issu de l'analyse discriminante.

	F > 0		F < 0
Cellules normales	53		19
Cellules polyomes	8		27

Le pourcentage des cellules normales du côté positif de l'axe est 73,6% tandis que celui des cellules polyomes du côté négatif de l'axe est 77,1% soit en moyenne un taux d'erreur de 25,2%. Une petite amélioration de la discrimination par rapport aux résultats précédents (cf. § 3.2.1.).

La répartition sur le même axe barycentrique des modalités est régulière. Toutes les modalités de rang 1 et une partie des rangs sont du côté négatif de l'axe. Les cellules polyomes sont plus petites que les cellules normales.

Figure 10 : Projection sur l'axe barycentrique des 20 modalités de variable associées à l'ensemble des cellules à contour lisses.

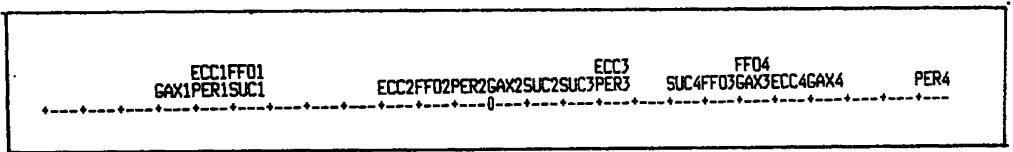
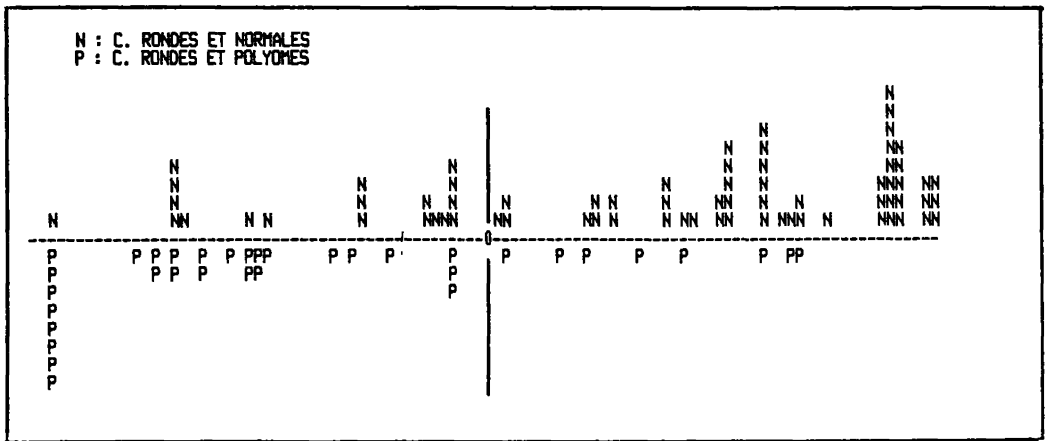


Figure 11 : Projection sur l'axe barycentrique en histogramme double des 107 cellules à contour lisse en éléments supplémentaires. Dans le but d'une lecture plus simple de cet histogramme, les cellules Normales ( N ) et transformées par le virus Polyome ( P ) sont projetées respectivement de part et d'autre de cet axe. Le point de séparation ou cloison sur celui-ci est matérialisé au milieu par le point 0. Une majorité de cellules Normales ( 73.6 % ) est projetée à droite alors que 77.1 % des cellules transformées par le virus Polyome est à gauche.



**3.2.3 Analyse discriminante des cellules multipolaires :** Le tableau principal 2x60 a une première ligne obtenue par la moyenne des 82 cellules normales et une deuxième qui donne le profil moyen des 121 cellules polyomes. Comme précédemment ces dernières seront de part et d'autre sur l'axe barycentrique. La répartition sur l'axe des cellules est représentée par un histogramme double.

	F > 0		F < 0
Cellules normales	69		13
Cellules polyomes	18		103

*Figure 13 :* Projection sur l'axe barycentrique en histogramme double des 203 cellules multipolaires en éléments supplémentaires. Les cellules Normales ( N projetées au dessus de l'axe ) et les cellules transformées par le virus Polyome ( P projetées en dessous ) se concentrent respectivement de part et d'autre du point de séparation 0 sur cet axe (84.2 & 85.1 %).

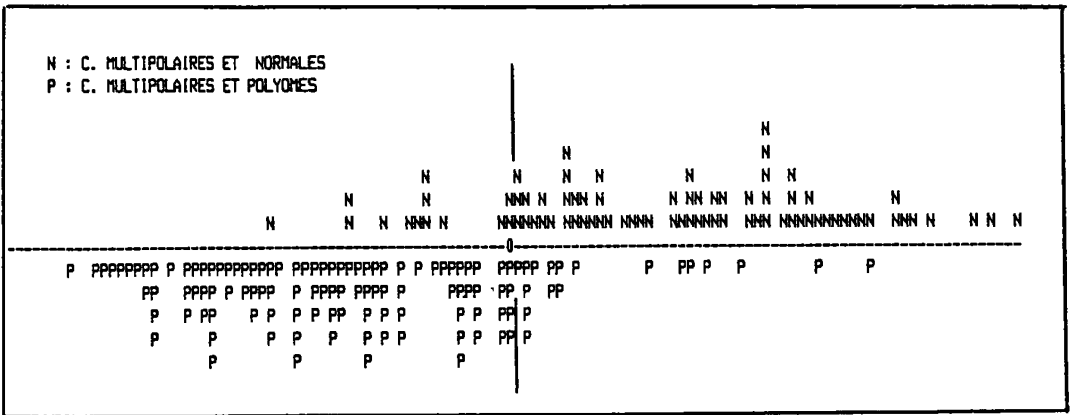
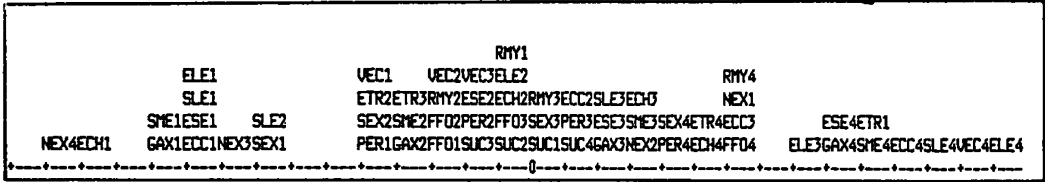


Figure 12 : Projection sur l'axe barycentrique des 60 modalités de variable associées à l'ensemble des cellules multipolaires.



Le pourcentage de cellules normales du côté positif de l'axe est 84,2% alors que celui des cellules polyomes du côté négatif est 85,1% ; soit en moyenne un taux d'erreur de 15,3%. Les deux populations apparaissent également dispersées puisque se séparant avec le même taux d'erreur. Celui-ci est nettement plus faible que dans les deux cas précédents : la discrimination est nettement meilleure. Excepté le nombre d'expansions cytoplasmiques (NEX), tous les rangs de modalités augmentent dans le sens de l'axe.

#### 4 . Discussion

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la forme des cellules *in vivo* et *in vitro*, est fonction de la conformation de leur cytosquelette, de la qualité de leur membrane, des protéines membranaires au sens large, et enfin, de leur affinité pour leur support. Toute modification, naturelle ou expérimentale de l'un au moins des éléments du triplet "cytosquelette-membrane-support" se traduit par une variation de la forme des cellules. La morphologie cellulaire peut être considérée, en première approximation, comme le reflet du métabolisme.

La quantification de la forme des cellules permet d'avoir accès directement, ou indirectement, à un grand nombre de leurs fonctions.

La méthode morphométrique d'analyse du contour des cellules en culture que nous avons proposée [7], et l'outil statistique que nous avons utilisé, ont permis, [9] et permettront, de progresser dans l'étude de la synergie "morphologie- métabolisme".

**4.1 Choix du modèle expérimental :** L'analyse et la comparaison morphologiques des fibroblastes FR.3T3 normaux (N.3T3) et transformés par le virus polyome (Py.3T3) se justifient pour deux raisons :

a) les différences morphologiques des cellules de ces deux souches peuvent être expliquées par des différences de leur affinité pour le support sur lequel elles sont cultivées [7]. En effet, la transformation des cellules par le virus polyome implique la synthèse de protéines virales qui interagissent de façon significative avec les membranes et les protéines membranaires responsables de leur fixation sur un support.

b) les durées des cycles cellulaires de ces deux souches ne sont pas significativement différentes (18 et 15 heures respectivement), de telle sorte que les différences morphologiques constatées sont essentiellement dues à la mise en place des processus de fixation sur leur support, et ne sont pas les conséquences de leur cinétique de croissance respective.

Des échantillons de 156 cellules de chacune des deux souches ont été analysés. Seules les cellules isolées sans contact avec d'autre cellule, ont été photographiés 48 heures après leur mise en culture.

Dans ces conditions, toutes les cellules ont repris un développement normal, et sont statistiquement chacune dans une étape différente du cycle cellulaire. D'autre part, comme les conséquences morphologiques et cinétiques des interactions intercellulaires ont été éliminées du fait des contraintes d'échantillonnage, les formes de chacune des cellules sont représentatives des caractéristiques intrinsèques des deux souches.

**4.2 Approche morphométrique :** L'observation de cellules en culture, et les données bibliographiques nous ont conduits à développer une méthode de quantification de leur forme qui prenne en compte à la fois des paramètres morphologiques globaux, caractérisant leur forme générale dans le plan d'observation ( le fond des boîtes de culture), et des paramètres morphologiques locaux associés aux expansions cytoplasmiques qu'elles envoient pour se fixer et se déplacer sur leur support [7].

L'algorithme d'analyse de la forme des tracés des contours cellulaires utilisé présente deux caractéristiques essentielles [7] :

a) il est très rapide, puisque l'échantillonnage des points du contour cellulaire proprement dit, est effectué après vectorisation de l'image de chaque cellule. Le codage vectoriel d'une image réduit son volume digital. Lorsque l'image est convexe le taux de compression de l'image est environ de 91%. Le nombre de vecteurs correspondant à une image d'ordre  $N \times N$  est environ égal à  $N$ . Ceci implique que la vitesse de traitement de l'image vectorielle augmente linéairement en fonction de sa taille [7, 11].

b) il est très souple, puisqu'il calcule les positions sur le contour cellulaire des points de convexité et de concavité importantes en parcourant le contour cellulaire point par point, et en mesurant pour chacun d'entre eux l'angle de déviation du tracé dont il est le sommet et sa distance par rapport au point de convexité ou de concavité précédemment échantillonné. (Les points de concavité du contour ont été utilisés pour définir les expansions cytoplasmiques ). Cette approche était essentielle, puisque les cellules présentent une grande diversité morphologique qui se prête mal à une segmentation globale, qu'impliquerait un algorithme fondé à partir de concepts géométriques définis a priori [7] .

**4.3. Intérêt de l'analyse des données :** Après l'analyse morphométrique proprement dite, on obtient 15 paramètres morphologiques par cellules de chacun des deux échantillons.

Pour un échantillon donné l'histogramme des fréquences de chaque paramètre permet de connaître la distribution des cellules autour d'une valeur moyenne. La comparaison, deux à deux des moyennes de paramètres homologues calculés à partir



des deux échantillons, détermine leur degré de similitude [7]. Mais, dans ce type d'approche, chaque paramètre est considéré comme suffisant, indépendant a priori des autres paramètres calculés, et significatif à lui seul, de la morphologie des cellules.

Seule, une analyse statistique appropriée et globale des résultats morphologiques devaient permettre de quantifier et de comparer les morphologies d'ensemble des deux souches et dont l'observation microscopique est évidente.

L'analyse factorielle, considérant chaque cellule par l'ensemble des paramètres morphologiques qui lui sont propres, a permis d'atteindre cet objectif [9].

## 5. Conclusion

**5.1 Principaux résultats :** Le premier résultat important obtenu après analyse factorielle des données morphométriques, c'est la partition des deux souches N.3T3 et Py.3T3 en deux sous populations homologues constituées respectivement de cellules à contour lisse et de cellules à contour multipolaire. L'analogie morphologique des deux sous populations homologues, au sein des deux échantillons, constitue un résultat remarquable qui a permis une discrimination plus nette.

L'analyse factorielle des données morphologiques obtenues à partir de l'union des deux échantillons N.3T3 et Py.3T3, ou de l'union de leurs sous populations homologues (cellules à contour lisse, cellules à contour multipolaire) montre que :

a) les cellules à contour lisse des deux échantillons présentent les mêmes types morphologiques fondamentaux, mais en proportions différentes. Les cellules normales à contour lisse, sont plus allongées que les cellules homologues transformées, essentiellement circulaires.

b) les cellules normales multipolaires sont plus allongées que les cellules multipolaires transformées. Celles-ci présentent un plus grand nombre d'expansions cytoplasmiques homogènes que les cellules normales homologues.

c) les proportions relatives de cellules à contour lisse et de cellules à contour multipolaire ne sont pas les mêmes au sein des deux populations: elles représentent respectivement environ 46 % et 54 % des cellules normales et 23 % et 77 % des cellules transformées.

Quant à la discrimination barycentrique, elle donne les mêmes résultats fondamentaux, mais permet surtout de mettre en évidence le degré d'homologie entre les cellules des deux échantillons. Les cellules à contour lisse et les cellules à contour multipolaire, échantillonnées parmi l'ensemble des deux populations, sont respectivement homologues pour 25 % et 15 % d'entre elles.

**5.2. Interpretation des résultats [9]:** Compte tenu de l'état actuel des connaissances, et l'originalité de l'approche morphométrique proposée, il est difficile de donner une explication simple des observations effectuées. Comme nous l'avons déjà précisé, la transformation virale induit une modification de l'affinité des cellules

pour leur support. Ceci constitue la raison essentielle pour laquelle les cellules transformées ont des morphologies différentes de celles des cellules normales.

En effet, les cellules transformées sont, en dernière analyse, plus rondes que les cellules normales et présentent un plus grand nombre d'expansions cytoplasmiques. Les expansions cytoplasmiques sont impliquées dans la dynamique d'étalement des cellules sur leur support (cf. § 1.2). Elles sont le siège de phénomènes séquentiels associant les microtubules, les filaments d'actine, les filaments intermédiaires (vimentine en particulier) et les membranes.

Les difficultés avec lesquelles ces cellules adhèrent sur leur support, leur imposent de rechercher de multiples points d'appui en adoptant une forme étoilée homogène dans toutes les directions du plan sur lequel elles reposent. En revanche, les cellules normales dont l'affinité pour le même support est grande, sont de forme plus simple et plus allongée, moins assujetties à un "bouillonnement" cytoplasmique que les cellules transformées.

L'homologie entre les cellules à contour lisse des deux souches peut être expliquée, d'une part, par la présence de cellules en division (en moyenne 5 % des populations observées), et par des stades précoces d'étalement identiques entre les deux souches. L'homologie entre les cellules multipolaires, (moins importantes que celle des cellules à contour lisse) est essentiellement due au recouvrement des cellules les plus petites, ce qui indique là encore, une similitude des stades précoces d'étalement des cellules sur leur support.

Ces quelques données doivent être complétées par des observations biochimiques, ultrastructurales et métaboliques, pour que leur interprétation soit définitive.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRINKLEY, B.R., (1982), Summary : organization of the cytoplasm. Cold Spring Harbor Laboratory Symposia on Quantitative Biology (XLVI) : 1029-1040.
- [2] FOLKMAN, J., MOSCONA, A., (1978), Role of cell shape in growth control Nature, 273 : 345-349.
- [3] HAEMMERLI, G., (1985), Principles of cell motility and these morphologic manifestations Expl. Biol. Med. 10 : 89-117.
- [4] ZIGMOND, S.H., LAUFFENBURGER, D.A., (1986), Assays of leukocyte chemotaxis Ann. Rev. Med. 37 : 149-155.
- [5] TOMASEK, J.J., HAY, E.D., (1984), Analysis of the role of microfilaments and microtubules in acquisition of bipolarity and elongation of fibroblasts in hydrated collagen gels. J. Cell Biol. 99 : 536-549.
- ECKERT, B.S., GAPUTI, S.E., WARREN, R.H., (1984), Dynamics of keratin filaments and intermediate filament distribution center during shape change in PtK1 cells. Cell Motility 4 : 169-181.
- IZZARD, C.S., IZZARD, S.L., DEPASQUALE, J.M., (1985), Molecular basis of cell-substrate adhesions Expl. Biol. Med. 10 : 1-22.
- SMALL, J.V., RINNERHALER, G., (1985), Cytostructural dynamics of contact formatin during fibroblast locomotion in vitro. Expl. Biol. Med. 10 : 54-68.
- HAY, E.D., (1985), Interaction of migrating embryonic cells with extracellular matrix. Expl. Biol. Med. 10 : 174-193.
- KIRSCHNER, M., MITCHISON, T., (1986), Beyond self-assembly : from microtubules to morphogenesis Cell 45 :329-342.
- [6] GARBAY, C., CHASSERY, J.M., BRUGAL, G, (1986), An iterative region growing process for image segmentation based on local color similarity and global shape criteria. Anal. Quant. Cytol. Histol. 8 (1) : 25-34.
- [7] SCHOEVAERT, D., CIBERT, C., (1986), Morphometric analysis of the outline of non-transformed and polyoma virus transformed FR.3T3 fibroblasts. Anal. Quant. Cytol. Histol. (sous presse).
- [8] BENZECRI, J.P., BENZECRI, F., (1980), Pratique de l'Analyse des Données, Analyse des Correspondances Dunod, Bordas ; Paris, Bruxelles, Montreal.
- [9] CIBERT, C., SKALLI, A., SCHOEVAERT, D., Statistic analysis of the morphometrically analyzed cultured cell outline shape. A comparison of normal and polyoma virus transformed FR.3T3 fibroblast outline. Anal. Quant. Cytol. Histol. (accepté pour publication).
- [10] SKALLI, A., Programme pour la discrimination barycentrique entre deux populations et l'etude par permutation aléatoire de la discriminabilité entre celles-ci. C.A.D. 1987 n°2.
- [11] SCHOEVAERT, D., Construction of the Minkowski operators in vectorized binary images. Computer Graphics and Image Process (en préparation).