

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION SPATIALE DES OVOGONIES DANS L'OVAIRE D'EMBRYON DE RATTE A L'AIDE DE L'ANALYSEUR DE TEXTURES

H. DIGABEL*, P. MAULÉON, J.-C. MARIANA et J. SERRA*

** Centre de Morphologie mathématique,
École des Mines de Paris,
77305 Fontainebleau (France)*

*I. N. R. A., Station de Physiologie de la Reproduction,
B. P. 1, Nouzilly, 37380 Monnaie (France)*

RÉSUMÉ

Pour étudier la répartition des ovogonies dans un ovaire d'embryon de Ratte de 15,25 jours on a utilisé une méthode d'analyse originale, l'étude de la covariance. La technique présentée demande un travail important de repérage des cellules ovogoniales. Par contre, l'étude morphologique ultérieure réalisée au moyen de l'analyseur de textures est rapide, fiable et difficile à effectuer autrement. Elle a permis de mettre en évidence une anisotropie de la répartition des ovogonies à petite échelle.

INTRODUCTION

Alors que l'on a établi le schéma des divisions cellulaires de la lignée spermatogénétique chez un certain nombre de mammifères, l'ovogenèse est un phénomène moins bien connu. Une des causes de cette dissymétrie est le manque de structure apparent de l'ovaire, qui rend difficile le repérage des cellules germinales. Des études quantitatives du tissu germinale ont été faites (BEAUMONT et MANDL, 1962 ; MAULÉON, 1967) mais elles ne permettent pas d'atteindre l'organisation de l'ovogenèse. Or l'existence d'un schéma de division implique une certaine répartition des cellules germinales à l'intérieur de la gonade. Dans cet esprit nous avons été conduits à essayer de caractériser la structure du tissu germinale à un instant donné de l'ovogenèse. Pour cela, nous avons utilisé une théorie mise au point au Centre de Morphologie mathématique de l'École des Mines de Paris (HAAS, MATHERON et SERRA, 1967 ; SERRA, 1972) et un appareil dont dispose ce centre pour étudier une gonade d'em-

bryon de Ratte de 15,25 jours. Cet âge a été choisi car ce stade étant antérieur à l'entrée en prophase méiotique, il n'y a qu'une sorte de cellules germinales dans la gonade, des ovogonies, ce qui simplifie le problème pour une première approche.

I. — CARACTÉRISTIQUE DE LA MÉTHODE D'ANALYSE UTILISÉE

A. — Définition de la covariance

Considérons une coupe de la gonade étudiée, et appelons A l'ensemble des ovogonies (fig. 1). Prenons un ensemble de deux points distants d'un vecteur \vec{h} (on note h son module, et α sa direction).

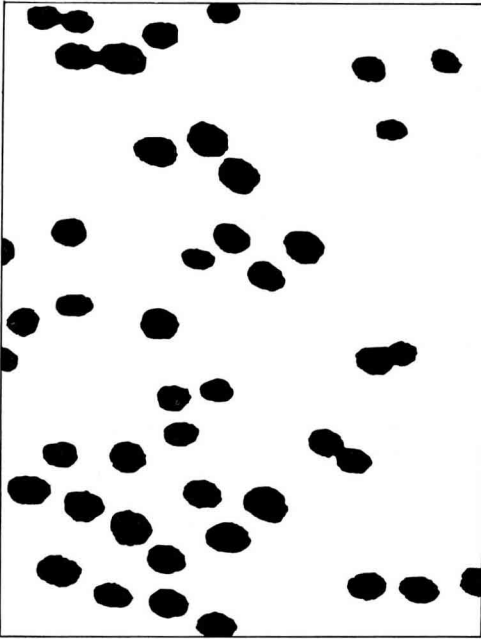


FIG. 1

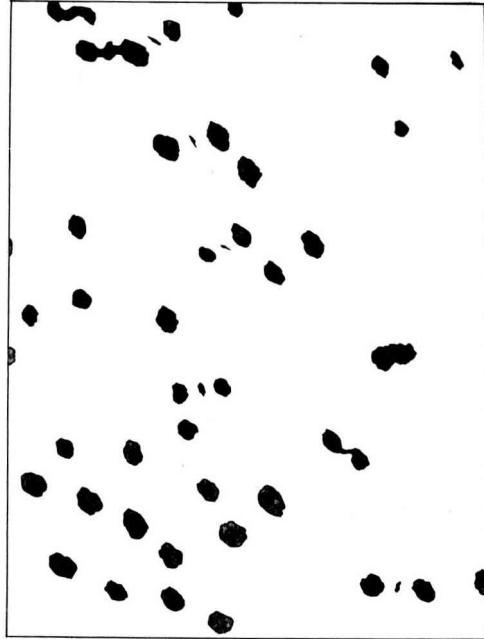


FIG. 2

Faisons décrire tout l'espace à un point M, et définissons de manière locale une figure $A'(\vec{h})$ de la manière suivante : le point M est dans A' si le doublet implanté en M est dans A (si les points M et $M + \vec{h}$ sont dans des ovogonies). Il est clair que la nouvelle figure ainsi obtenue (fig. 2) ne dépend que de A et \vec{h} . La surface de $A'(\vec{h})$ que l'on note $C(\vec{h}) = C(h, \alpha)$ est ce que l'on appelle la covariance de la figure A.

Comme l'outil morphologique essentiel dans cette étude est la covariance, nous allons détailler ses propriétés. On peut les séparer en deux groupes, celles dues à h , et celles dues à α .

B. — Propriétés liées à h

Dans tout ce paragraphe on se place à $\alpha = \alpha_0$ constant.

a) Portée.

On appelle portée le nombre $a(\alpha_0)$ tel que $h > a \Rightarrow C(h, \alpha_0) = 0$. Elle donne donc une idée de l'échelle de la régionalisation, car dans la direction α_0 , on ne peut pas avoir deux points du milieu étudié distants de plus de $a(\alpha_0)$.

b) *Mise en évidence des macrostructures.*

Cette propriété de la covariance est l'un de son intérêt majeur dans la présente étude. En effet la covariance permet de renseigner sur l'existence de distances privilégiées dans la régionalisation, donc sur la présence de macrostructures.

Pour mettre en évidence cette propriété intéressante, nous allons procéder par étapes.

— Supposons tout d'abord que nous ayons une régionalisation périodique de période λ (dans la direction α_0). Si un point x est dans un grain tous les points $x + \lambda$ sont dans un autre grain, de même les points $x + 2\lambda$, etc. (fig. 3).

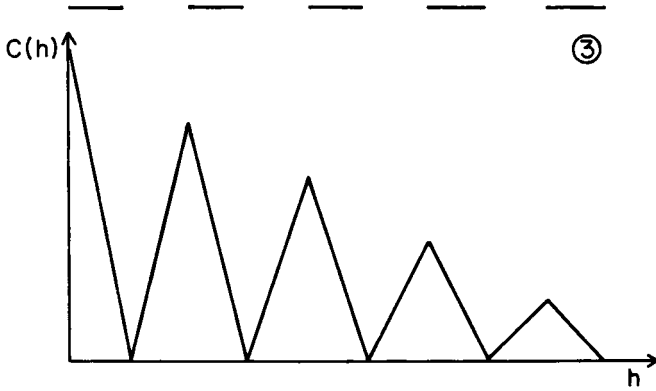


FIG. 3

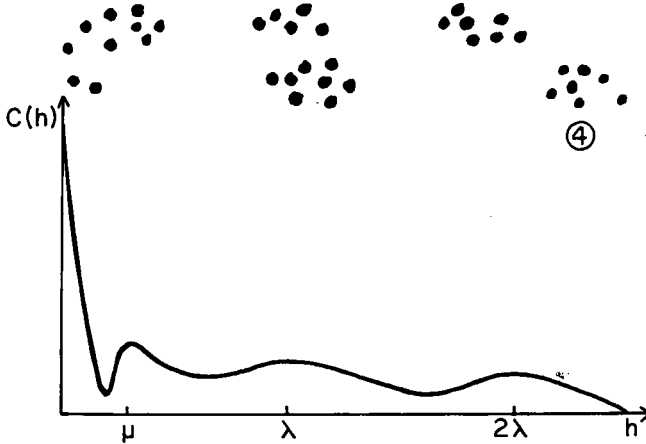


FIG. 4

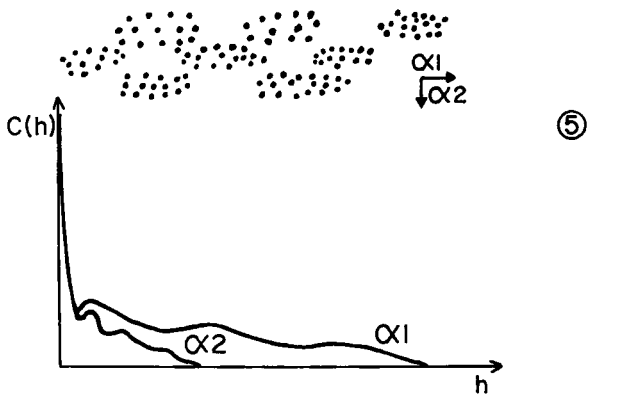


FIG. 5

La covariance d'une fonction périodique est donc une fonction ayant des extrémums relatifs pour $h = h\lambda$.

— Considérons maintenant une régionalisation ayant des amas, la distance moyenne (dans la direction α_0) entre les centres des amas étant λ . Si un point x est dans un amas le point $(x + \lambda)$ a plus de chances d'être dans le milieu étudié que le point $(x + \lambda \pm \Delta\lambda)$ car le point $(x + \lambda)$ a de fortes chances d'être dans un amas voisin. La covariance de cette régionalisation présentera donc un maximum relatif en $h = \lambda$. Un tel exemple est illustré par la figure 4.

Le premier extrémum relatif, pour $h = \mu$ caractérise la plus petite distance préférentielle, c'est-à-dire la distance entre les centres de grains voisins.

c) *Comportement à l'origine.*

D'après la définition de la covariance, $C(0)$ est l'aire de A .

Cette grandeur ne dépend évidemment pas de α ; elle permet donc d'avoir une idée de la précision des mesures dans des séries de manipulations portant sur plusieurs directions.

C. — *Propriétés liées à α*

a) *Détermination des anisotropies.*

La mesure de covariances dans des directions différentes permet de tester l'isotropie d'une régionalisation, en étudiant l'indépendance de la portée et des distances préférentielles de la direction α (fig. 5).

b) *Comportement à l'origine.*

Le comportement à l'origine de la covariance est un paramètre morphologique important, puisqu'il permet d'atteindre la surface de contact des ovogonies et du tissu interstitiel. On démontre en effet que l'on a :

$$S = \frac{1}{\pi} \int C'(0, \alpha) d\alpha$$

où $d\alpha$ est un angle solide. L'intégration porte donc sur 4π stéradians. Il peut sembler paradoxal qu'à l'aide d'observations linéaires, on puisse découvrir une surface de R^2 . Cela se démontre de manière générale, et une conséquence de la formule de Crofton peut s'énoncer ainsi : « Le nombre de dimensions de l'élément structurant additionné à celui de la grandeur qu'on veut atteindre, est égal à la dimension de l'espace euclidien dans lequel on se place. » Ainsi une mesure linéaire dans R^3 fournit une surface (dimension 2).

Remarque : La covariance n'est qu'un cas particulier d'une transformation plus générale, l'érosion. Ainsi, la figure $A(\vec{h})$ n'est autre que l'érodé de A par un doublet. Cet ensemble de 2 points qui joue un rôle de figure informante est dénommé « élément structurant ». On définit, outre l'érosion, d'autres transformations (SERRA, 1972) appelées transformation par tout ou rien qui agissent par l'intermédiaire d'éléments structurants quelconques. On regroupe l'étude des figures ainsi obtenues dans le but d'effectuer une analyse structurale d'un milieu sous le nom de morphologie mathématique.

II. — CARACTÉRISTIQUE DE L'APPAREIL DE MESURE

L'analyseur de textures est un micro ordinateur spécialement adapté à la mesure des paramètres morphologiques. Il a été conçu et réalisé au Centre de Morphologie mathématique de l'École des Mines de Paris (KLEIN, 1970 ; KLEIN et SERRA, 1972), ainsi qu'à l'I. R. S. I. D. (1).

(1) Sa réalisation industrielle et son développement commercial sont assurés par Leitz.

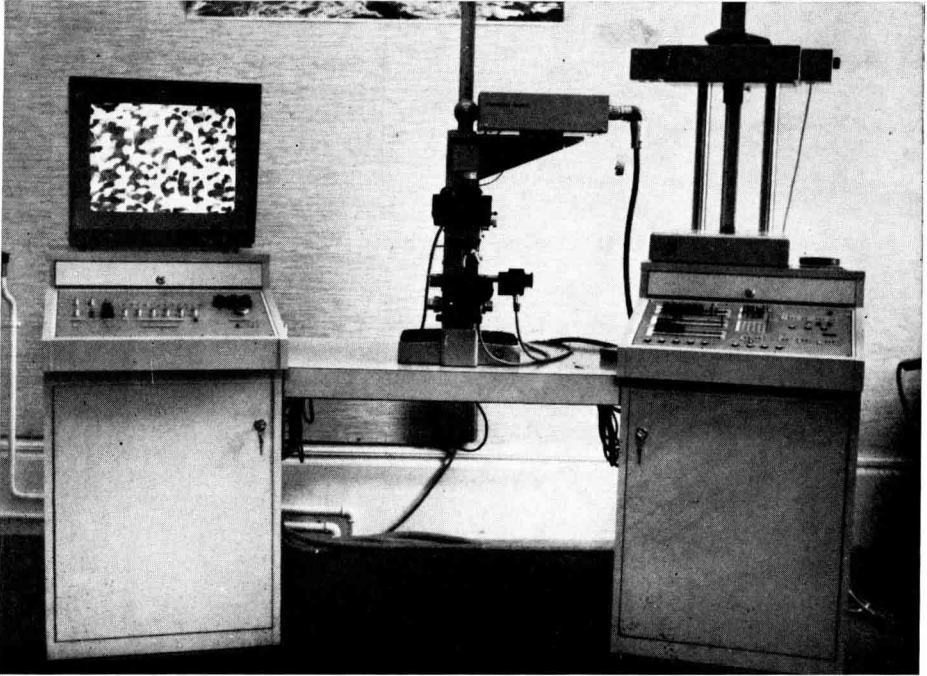


FIG. 6. — *Analyseur de textures*

Au centre, le microscope et la caméra TV. A gauche le réglage de la caméra, les seuils permettant de sélectionner les milieux à étudier, la visualisation des opérations logiques effectuées. A droite on distingue l'unité centrale avec ses matrices de programmation. Sur l'armoire de droite on aperçoit le dispositif permettant d'utiliser des objets macroscopiques en entrée.

La logique de cet appareil est spécifique, car elle n'est que la traduction électronique de la morphologie mathématique. L'opération élémentaire réalisée par cet appareil est donc la transformation par tout ou rien. Décrivons sommairement cet appareil.

A. — Entrées

L'entrée est optique. On peut donc étudier directement des milieux *in situ* à l'aide d'un microscope, ou macroscopiquement si l'on dispose de photographies. L'image optique est ensuite analysée au moyen d'une caméra TV. L'étape ultérieure est la sélection des constituants à étudier. Le principe de cette discrimination repose sur des comparateurs de tension, ce qui permet d'isoler toute la partie de la figure initiale se trouvant dans une certaine zone de gris vue par la caméra. Ce procédé, satisfaisant dans certains domaines (métallurgie, pétrographie...) est généralement insuffisant pour permettre d'étudier directement des échantillons de tissus en biologie. Néanmoins on peut résoudre les problèmes d'entrée en prenant comme image de départ des photographies des échantillons sur film à fort contraste.

B. — Logique et programmation

Une fois que le milieu à étudier est isolé (ce qui correspond à la donnée d'un sous-ensemble A du plan), la fonction caractéristique I_A de ce milieu ($I_A(M) = 1$ si M est un point de A et 0 sinon) est envoyée dans des mémoires à décalage permettant d'effectuer les opérations élémentaires de la morphologie mathématique. Le rôle de l'opérateur est donc triple :

- vérifier la justesse de la sélection des constituants,
- programmer l'élément structurant choisi,
- programmer la transformation choisie (qui est une combinaison de transformations par tout ou rien).

C. — *Les éléments structurants disponibles*

Éléments linéaires. — Ils permettent d'atteindre les périmètres, les covariances et les granulométries linéaires.

Éléments bidimensionnels.

- *Isotropes* : Des hexagones, dont chaque côté a une longueur programmée.
- *Anisotropes* : Ces éléments structurants permettent d'atteindre le nombre, ou la loi des rayons de courbure.

Signalons enfin que la liste des éléments structurants que nous avons donnée n'est nullement exhaustive. En face d'un problème très particulier, un opérateur connaissant bien l'appareil peut itérer plusieurs opérations sur la figure pour analyser au mieux son échantillon.

D. — *Exécution des mesures*

Pour des raisons statistiques évidentes, on prend en général plusieurs champs de mesure sur chaque échantillon. Des études d'anisotropie peuvent nécessiter des mesures dans plusieurs directions. L'appareil comporte une platine et un prisme programmables permettant une réalisation automatique des rotations et déplacements de l'échantillon. Les résultats de mesure peuvent être sortis sur télétype ou perforés sur bande ou enfin traités dans un petit ordinateur. Il est prévu que la programmation de l'appareil puisse se faire depuis ce calculateur pour remplacer le système actuel de matrices qui est peu utile pour quelqu'un ne connaissant pas à fond la technologie de l'appareil. L'ensemble de l'appareil est représenté sur la figure 6.

III. — APPLICATION DE CETTE MÉTHODE D'ANALYSE AU CAS DE LA DISTRIBUTION SPATIALE DES OVOGONIES

A. — *Problèmes particuliers expérimentaux*

Le manque de coloration spécifique des ovogonies ne nous a pas permis d'étudier directement les coupes d'ovaires. Pour pallier cet inconvénient, les ovogonies ont été identifiées au microscope et localisées sur des photographies ⁽¹⁾ des coupes d'ovaires (au grossissement 888). Les cellules ainsi marquées ont ensuite été décalquées. Les taches noires sur un fond de couleur claire et uniforme permettent une discrimination excellente du milieu ovogonial à l'analyseur de textures.

Mais lorsqu'on veut étudier une coupe, a-t-on le droit de sélectionner arbitrairement une partie de la figure pour effectuer des mesures ou bien est-on contraint d'analyser la coupe globalement? Une étude d'après la théorie des variables régionalisée (MATHERON, 1965) nous a permis d'opter pour la seconde hypothèse. Ceci était d'ailleurs prévisible, étant donnée la pauvreté en ovogonies de la partie externe de la gonade, qui traduit une corrélation entre la régionalisation des ovogonies et la géométrie de l'ovaire.

Comme le problème posé était relatif à la répartition des ovogonies, le fait que les coupes aient une certaine épaisseur (5 μ) ne nous a pas semblé gênant et l'on a toujours raisonné comme si l'on avait disposé de coupes infiniment minces.

La structure de l'échantillonnage dans l'ovaire est très particulière. Si \vec{h} est un vecteur de R^3 parallèle aux plans de coupes et $C_i(\vec{h})$ la covariance des ovogonies mesurée dans la $i^{\text{ème}}$ coupe, $\sum C_i(\vec{h})$ est, à une constante multiplicative près, un estimateur sans biais de la covariance de la population tridimensionnelle. Mais on voit

(1) Sur papier calque négatif.

que l'étude de cette covariance ne permettra pas de mettre en évidence des dérivés dans une direction quelconque. Seules les anomalies directionnelles parallèles aux plans de coupe pourront être étudiées. De même on ne pourra pas estimer des valeurs moyennes de la covariance pour toutes les directions α de l'espace tridimensionnel : la surface des ovogonies, par exemple, est inaccessible.

B. — Résultats expérimentaux

L'étude a été faite sur 15 coupes sériées de 5μ d'épaisseur distantes de 25μ provenant d'un ovaire d'embryon de Ratte de 15, 25 jours. Les coupes ont été orientées comme le montre la figure 7 pour l'étude de la covariance.

A l'aide de l'analyseur de textures nous avons mesuré la covariance de l'échantillon dans les trois directions indiquées sur la figure 7. L'une des courbes obtenues est représentée par la figure 8.

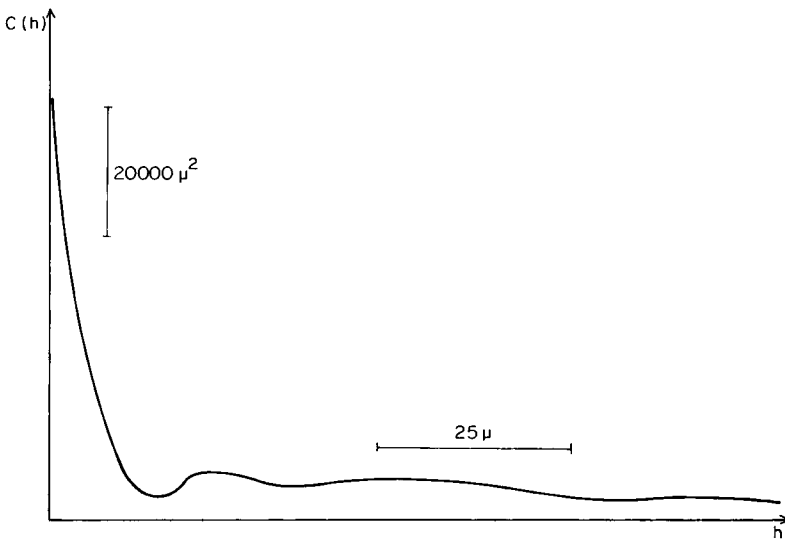


FIG. 8

Nous avons vu précédemment que la présence ou l'absence de « paquets » peut s'étudier en fonction de la décroissance de la covariance. La partie ayant une pente très forte étant liée à l'ovogonie moyenne (la dérivée élevée à l'origine indique que l'on a beaucoup de grains), nous avons porté la partie de la covariance relative à $|h| < 100 \mu$ sur graphique isolé ayant une échelle des ordonnées adaptée à l'étude des fluctuations de la covariance (fig. 9).

On remarque sur ce graphique que si les directions $\alpha = 0$ et $\alpha = \frac{\pi}{3}$ ont leurs premiers extrémums relatifs à des abscisses comparables, il n'en est pas de même pour $\alpha = \frac{2\pi}{3}$. De plus, le premier maximum relatif dans les directions $\alpha = 0$ et $\alpha = \frac{\pi}{3}$, ($|h| = 19 \mu$) correspond à un minimum pour $\alpha = \frac{2\pi}{3}$.

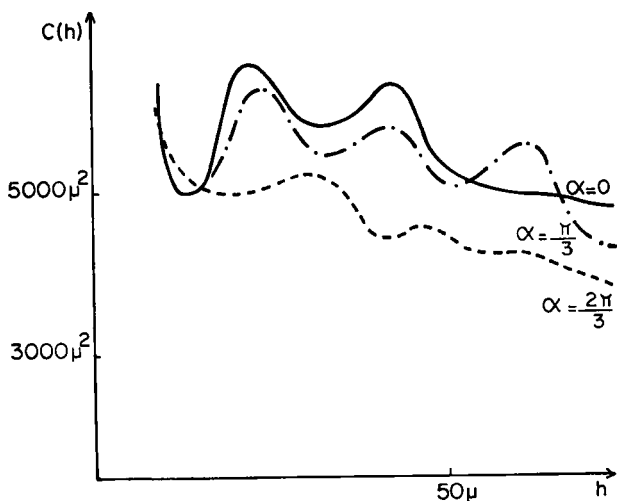


FIG. 9

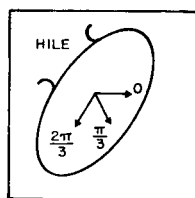


FIG. 7

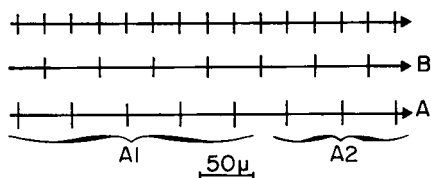


FIG. 10

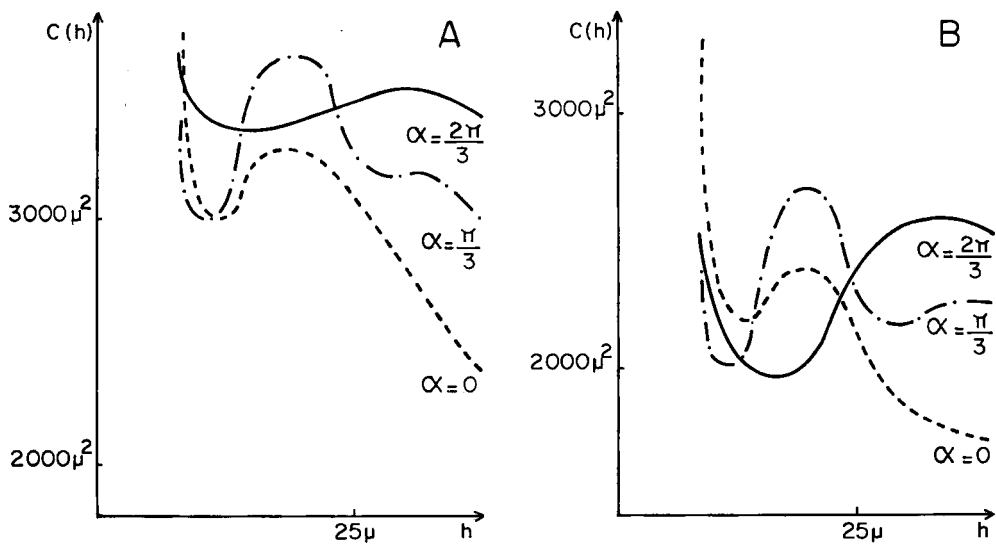


FIG. 11

Pour apprécier la valeur générale de ce résultat nous avons fragmenté l'échantillon de deux manières différentes (fig. 10) :

— En considérant l'ensemble A des coupes de numéro pair et l'ensemble B des coupes de rang impair. On constate que la même conclusion quand aux abscisses des extrémums subsiste sur les covariances des échantillons A et B prises séparément (fig. 11).

— En formant les échantillons A_1 et A_2 comme l'indique la figure 10 : on constate que les covariances de A_1 et A_2 ont également les caractéristiques précitées. La figure 12 montre la covariance de A_1 et A_2 pour $\alpha = 2\pi/3$ à titre d'exemple.

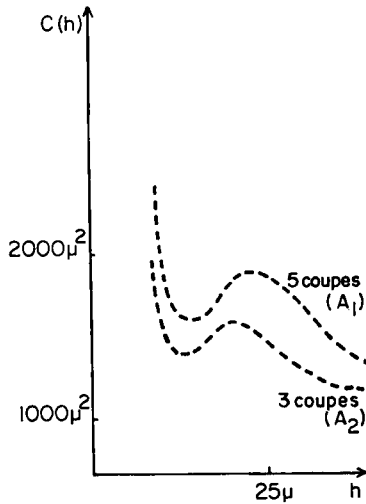


FIG. 12

Les résultats des différentes mesures effectuées selon le plan d'expérience cité ci-dessus permettent de conclure que les allures des débuts des courbes de covariance sont significatives.

C. — *Interprétation des résultats*

Le premier maximum pour $\alpha = 0$ et $\alpha = \frac{\pi}{3}$ a lieu pour $h = 19 \mu$ et il signifie que si des grains sont proches, leurs centres sont à 19μ (ce qui est compatible avec leur diamètre moyen de l'ordre de 10μ). On observe en effet sur les coupes de nombreux grains associés par deux ou par trois à ces distances. Au contraire, dans la direction $\frac{2\pi}{3}$, cette distance de 19μ est un minimum de la covariance : si un point est dans un grain, il y a peu de chance que son translaté dans le vecteur $(19 \mu, 2\pi/3)$ soit dans un grain (car le maximum de la covariance dans cette direction est atteint pour 35μ).

On peut regrouper ces résultats en cartographiant les relations moyennes de proximité des ovogonies (fig. 13).

Ce croquis représente le modèle le plus probable de distribution des cellules filles autour d'une cellule souche dans l'espace à 2 dimensions.

Du point de vue de la covariance, tout se passe comme si les ovogonies se répartissaient en paquets anisotropes, de motif élémentaire celui indiqué figure 13. On

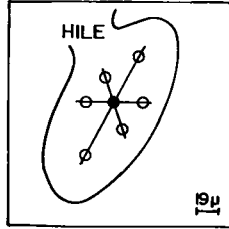


FIG. 13

notera bien que cette anisotropie et celle de la forme globale de l'ovaire (et donc de ses coupes) sont deux phénomènes distincts. L'ovaire pourrait fort bien être allongé dans une direction, et les paquets élémentaires d'ovogonies dans la direction perpendiculaire, car la notion d'isotropie est définie à une échelle donnée, et non pas une fois pour toutes. Ces différentes échelles correspondent aux distances plus ou moins lointaines repérées sur l'axe des abscisses des covariances. Ainsi la structure (anisotrope) à petite échelle que nous avons découverte se traduit par des pseudo-périodicités au début de la covariance, pour des valeurs du paramètre d'échelle h , inférieures à 50μ . Il est raisonnable de penser que cette anisotropie est liée à l'organogenèse. En effet le rapport $19/35$ est sensiblement égal à l'allongement de l'ovaire dans le plan des coupes. Le fait de retrouver localement dans les groupes de cellules la géométrie globale de l'ovaire semble donc montrer qu'une loi commune régit le développement de l'ovaire à toutes les échelles.

SUMMARY

STUDY OF THE SPACIAL DISTRIBUTION OF OOGONIA IN EMBRYONIC RAT OVARY WITH A TEXTURE ANALYZER

In order to study the distribution of oogonia in the embryonic rat ovary at 15-25 days, an original method of analysis was used, a covariance study. The technique presented requires a complex procedure of location of oogonial cells. On the other hand, the subsequent morphological study carried out using a texture analyzer, is rapid, reliable and difficult to do otherwise. These techniques have enabled us to demonstrate an *anisotropy* in the distribution of oogonia on a small scale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEAUMONT H., MANDL A., 1962. A quantitative and cytological study of ovogonia and ovocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc. Roy. Soc. B*, **155**, 557-579.
- DIGABEL H., 1971. Répartition spatiale des ovogonies dans un ovaire d'embryon de ratte de 15 j 1/4 étudiée au moyen de la morphologie mathématique. *Rapport de stage I. N. R. A.*, 1972. Estimation du volume ovogonial d'une partie de gonade (non publié).

- HAAS A., MATHERON G., SERRA J., 1967. Morphologie mathématique et granulométries en place. *An. Mines*, **11**, p. 735-753 ; **12**, p. 767-782.
- KLEIN J.-C., SERRA J., 1972. The texture analyzer. *J. Microsc.*, **95**, 349-356.
- MATHERON G., 1965. *Les variables régionalisées et leur estimation*, Masson, Paris.
- MATHERON G., 1967. *Éléments pour une théorie des milieux poreux*, Masson, Paris.
- MAULÉON P., 1967. Cinétique de l'ovogénèse chez les Mammifères. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. expél.*, **56** (suppl. 3-4), 125-150.
- SERRA J., 1972. Stereology and structuring elements. *J. Microsc.*, **95**, 93-103.
-