



HAL
open science

Méthodes robustes en traitement d'image pour la détection et la caractérisation d'objets compacts : application à la biologie

Ambroise Marin

► **To cite this version:**

Ambroise Marin. Méthodes robustes en traitement d'image pour la détection et la caractérisation d'objets compacts : application à la biologie. Traitement du signal et de l'image [eess.SP]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCK018 . tel-02191661

HAL Id: tel-02191661

<https://theses.hal.science/tel-02191661v1>

Submitted on 23 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.



**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A AGROSUP DIJON**

Ecole doctorale n°554

Environnement Santé

Doctorat de Génie Informatique, Automatique et Traitement Du Signal

Par

MARIN Ambroise

Méthodes robustes en traitement d'image pour la détection et la caractérisation d'objets compacts. Application à la biologie.

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 5 juillet 2019

Composition du Jury :

Pr Frédéric Morain Nicolier
Pr Ludovic Macaire
Pr Fan Yang
Pr John Aldo Lee
Pr Paul Molin
Dr Ludovic Journaux
Pr Johel Miteran
Dr François Anquez

Professeur à l'université de Reims
Professeur à l'université de Lille
Professeur à l'université de Bourgogne
Professeur à l'Université Catholique de Louvain
Professeur à Agrosup Dijon
Maitre de conférences à Agrosup Dijon
Professeur à l'université de Bourgogne
Maitre de conférences à l'université de Lille

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Président du jury
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse
Invité
Invité

Table des matières

Remerciements	6
Introduction générale.....	8
1. Contexte de l'étude.....	9
2. Plan.....	10
a. Chapitre 1 : Contexte et Problématiques	10
b. Chapitre 2 : Identification, caractérisation et effacement d'un artefact constitutif des images	11
c. Chapitre 3 : Comptage cellulaire	12
d. Chapitre 4 : Caractérisation de structures intracellulaires : estimation du nombre d'agrégats ribo nucléoprotéiques (RNPs)	12
Chapitre 1 : contexte et problématiques	16
1. Problématique biologique	16
a. Pourquoi étudier les micro-organismes, historique rapide et intérêt en agroalimentaire	17
b. Comment étudier les micro-organismes ? Comment accéder aux données pertinentes ?	19
2. L'imagerie microscopique.....	35
a. Généralités sur l'image numérique.....	36
b. Outils d'acquisition.....	37
c. Les problèmes liés aux outils d'acquisition.....	38
d. Etat de l'art sur la microscopie optique	42
e. Types d'images.....	44
f. Les problèmes liés à l'imagerie numérique	45
g. Stratégie de traitement d'image	47
3. Du cas d'étude biologique aux problématiques de traitement d'image	49
a. Survie des levures en présence d'un stress osmotique	50

b. Survie des levures en présence de stress thermiques : Etude de l'apparition d'agrégats ribo nucléoprotéiques	52
Chapitre 2 : Identification, caractérisation et effacement d'un artefact constitutif des images	58
1. Introduction	58
a. Objectifs.....	60
b. Problématiques « image ».....	60
c. Plan du chapitre	62
2. Concepts généraux	62
a. La transformée de Fourier discrète	62
b. La transformée de Hough linéaire	63
3. Prétraitements des images	66
a. Traitement du bruit	66
b. Traitement du gradient d'illumination, filtrage homomorphique.....	68
4. Détection de la grille dans l'image.....	71
a. Détection de la grille : Approche naïve utilisant directement la transformée de Hough	74
b. Détection de la grille : approche fréquentielle basée sur la transformée de Fourier .	78
c. Optimisation du calcul de la transformée de Fourier discrète et de la recherche de signature	81
5. Caractérisation de la grille.....	82
a. Qu'est-ce qu'un bon positionnement pour un barreau de grille ?	83
b. Evaluation de la qualité du positionnement des barreaux de la grille	85
c. Robustesse de la caractérisation de la grille	88
d. Résultats.....	93
6. Effacement de la grille	95
a. Séparation d'un signal aléatoire et d'un signal périodique en 1 dimension :	96
b. Effacement de la grille dans l'image :	98
7. Conclusion.....	104

Chapitre 3 : Comptage cellulaire.....	108
1. Introduction	108
2. Concepts généraux	109
a. Transformée de Hough Circulaire	109
b. La transformée de Hough par gradient.....	112
3. La détection et le comptage des cellules	114
a. Pourquoi choisir la transformée de Hough par gradient ?.....	114
b. Calcul du champ de gradients dans l'image	115
c. Calcul de la transformée de Hough par gradient	117
d. Problématiques liées à la recherche de pics dans l'accumulateur	118
e. Listes locales de contributeurs et matrices d'usages des contributions : la déconstruction des pics	119
f. Problème de la condition d'arrêt	122
g. Détermination du rayon des cercles.....	124
h. Comparaison GAT/LCL/UCM versus CHT.....	127
i. Performance de la méthode	127
4. Résultats	129
5. Conclusion.....	130
Chapitre 4 : Caractérisation de structures intracellulaires : estimation du nombre d'agrégats ribo nucléoprotéiques (RNPs).....	134
1. Introduction et problématique	134
2. Matériel et méthodes	135
a. Qu'est-ce que la fluorescence ?	135
b. La microscopie biphotonique	136
c. Les méthodes de description de texture.....	138
d. Méthodes de classification.....	145
3. Application à l'étude des agrégats ribo nucléoprotéiques.....	158
a. Cas n°1 : présence de fluorescence diffuse	159

b. Cas n°2 : absence de fluorescence diffuse.....	185
4. Conclusion.....	192
Conclusion générale	196
Perspectives.....	198
Bibliographie.....	202
Annexes.....	210
Annexe 1 : Morphologie mathématiques.....	210
a. L'image binaire.....	210
b. La translation	211
c. La réflexion.....	211
d. La complémentation	212
e. La différence.....	212
f. L'élément structurant.....	212
g. Opérateurs de base et leurs combinaisons	213
Annexe 2 : précision sur les paramètres de calcul de la transformée de Hough linéaire ...	218
Annexe 3 : Reproduction du formulaire d'évaluation manuelle du nombre d'agrégats ribo nucléoprotéiques.....	220
Annexe 4 : Calcul des paramètres de texture de Haralick.....	226
Annexe 5 : Importance biologique du stress osmotique et relation avec la cellule.....	229
Annexe 6 : Contributions.....	230
a. A robust generic method for grid detection in white light microscopy Malassez blade images in context of cell counting	230
b. Reliable detection and smart deletion of Malassez counting chamber grid in microscopic white light images for microbiological applications	242
c. Automatic biological cell counting using a modified gradient Hough transform ...	250
d. Automatic counting of intra-cellular ribonucleo-protein aggregates in <i>saccharomyces cerevisiae</i> using a textural approach	262

Remerciements

En préambule à cette section, je tiens à préciser à quel point il est difficile d'exprimer la force de chaque « merci » ! Le travail de thèse est le commencement, j'espère, d'une nouvelle aventure mais également la fin de la précédente... et quelle aventure ! Pour ma part, ces quelques années, partagées entre mon poste d'ingénieur et le travail de recherche, ont été particulièrement éprouvantes et, à l'heure d'écrire ces lignes, il me semble clair que tout ceci n'aurait été possible sans la présence de personnes exceptionnelles qui devraient se reconnaître :

Tout d'abord, merci à mes parents, à mes sœurs et mes neveux et nièces, à ma famille, à mes amis qui sont toujours là pour croire en leur fils, frère, (super)tonton, cousin, neveu ou ami !

Merci Mr François Roche-bruyn, directeur d'Agrosup d'avoir acté pour rendre ce travail possible et Hélène Poirier pour le soutien sans faille de la direction scientifique.

Merci à tous les membres de l'équipe, du laboratoire et d'Agrosup pour les échanges scientifiques sur la biologie, l'imagerie, la microscopie... C'est à mon sens, ces échanges et cette possibilité de découvrir de nouvelles choses tous les jours qui rendent le milieu de la recherche si enrichissant ! En particulier, merci Jean-François, euh, Jeff, pour ton aide concernant la microbiologie.

Merci Sylvie, pour ta sympathie et surtout, d'être là quand il le faut, avec un petit café qui fait du bien !

Merci Lucile pour le coup de main en direct d'AgroParisTech.

Merci Cricri et Laulau pour tout !! D'être les premières à avoir cru en moi et de m'avoir donné ma chance professionnellement mais aussi scientifiquement, de tous vos précieux conseils, de toutes ces « poilades » également ! Sans votre bienveillance de tous les instants, tout ce travail n'aurait jamais pu débiter. Cheffe Dumas et cheffe Le Noan, vous êtes les meilleures, ne changez rien !

Merci John Aldo et Johel d'avoir accepté de participer aux comités de thèse et que l'on ait pu, grâce à vous, en faire des moments très constructifs, merci également à Jean-Marie d'avoir assuré l'intérim de Johel, avec le même esprit scientifique, lorsque ça a été nécessaire.

Merci Stéphane, merci d'avoir tant de problèmes ! Et surtout d'avoir choisi de travailler avec Ludo, Paul, Emmanuel et moi pour en résoudre une grande partie. Merci de nous transmettre une partie de ta passion dévorante pour la recherche et de nous prouver tous les jours qu'on peut être sérieux et fun !

Merci Paul, évidemment ! D'être là, avec toute ta passion pour la recherche et ta soif inextinguible de révolutionner le monde à grand renfort d'équations et de dissection méthodique de toutes les petites finesses de chaque méthode ou algorithme. Surtout, merci de ne jamais m'avoir laissé tomber durant les moments parfois très difficiles de cette aventure

Merci mon Ludo d'avoir trouvé les mots lors du dernier été de ce travail, la période la plus dure, pour beaucoup de raisons personnelles et professionnelles, pour me relancer et me redonner le plaisir et la passion nécessaire pour y arriver quand je n'y croyais plus. L'adage dit que c'est dans le besoin qu'on reconnaît ses amis, grâce à toi, je sais qu'on peut les reconnaître également dans un bon verre de vin ou de Kwak® !

Enfin, merci Emmanuel, ou plutôt, docteur Denimal!

Introduction générale

De nombreuses études microbiologiques reposent sur une observation directe des microorganismes dans le but de comprendre et étudier leur comportement dans des conditions spécifiques. L'observation de l'état d'un micro-organisme peut se faire soit par celle d'une colonie (comptage), soit au niveau de la cellule elle-même, pour mettre en relation les paramètres morphologiques (forme, taille, texture...) et les paramètres vitaux des microorganismes. L'extraction d'information et de variables pertinentes à l'échelle microscopique pose de nombreuses difficultés dont les trois principales sont :

La subjectivité de l'expert : lors de l'analyse, en fonction de son expérience et de ses connaissances *a priori*, il existe toujours une part de subjectivité dans l'observation. De plus, les comptages peuvent varier en fonction de l'état de fatigue et de la lassitude après avoir expertisé un nombre important d'images.

La mauvaise reproductibilité : Les observations reposent la plupart du temps sur des protocoles répétables, stricts et souvent complexes à mettre en œuvre. Dans le cas où la méthode doit être répétée sur un autre lieu d'étude, les conditions n'étant pas nécessairement standards dans l'espace et le temps, il est alors très difficile de garantir la constance d'un résultat d'observation par un expert. De plus, dans le cas d'une étude à large échelle et avec un grand nombre de répétition, il est souvent inévitable de multiplier le nombre d'experts, d'où des variations dans la prise de données malgré une mise au point de techniques standards.

Le coût financier, temporel et humain : Les observations réalisées par des experts représentent un coût important, financier d'une part mais aussi temporel et humain (temps de l'expertise elle-même, auquel s'ajoute le temps d'attente de disponibilité de l'expert). Ce coût est malheureusement limitant.

Pour toutes ces raisons, recueillir l'ensemble des observations à l'échelle microscopique nécessite un effort non négligeable sur ces trois difficultés. Pour éviter ce lourd travail manuel et les problèmes qui en découlent, l'analyse d'images via des algorithmes de traitement d'image constitue un outil des plus intéressants.

Ce travail s'inscrit à la frontière de deux disciplines : la microbiologie et le traitement des images. Nous cherchons à mettre au point un protocole méthodologique adapté à l'analyse de

procédés microbiologiques via de nouveaux outils de traitement d'image. Dans cette optique, il est alors essentiel d'adopter une stratégie d'analyse cohérente depuis l'acquisition des images jusqu'à l'extraction d'informations pertinentes.

Les deux objectifs principaux à atteindre sont :

- Une **normalisation** optimale de l'extraction des variables d'intérêt à travers les techniques de traitement d'images les plus récentes. Elle doit être conçue pour obtenir une plus grande objectivité dans l'acquisition des données microscopiques ainsi qu'une meilleure reproductibilité de la méthode dans le cas d'une étude temporelle et/ou répétée.
- Une **automatisation** maximale du travail. Ceci permettrait une plus grande rapidité d'exécution, une plus grande objectivité, ainsi qu'un gain important en temps et en argent tout en évitant le fastidieux travail manuel d'observation. Cet objectif d'automatisation coïncide avec l'objectif de **robustesse**. Il est important de noter qu'il existe des systèmes d'observation automatisés commerciaux (Cellometer Auto 1000¹). Ces derniers nécessitent pour fonctionner des conditions contrôlées (milieu de culture, homogénéité des cultures...). Or, certaines études mettent en œuvre des protocoles expérimentaux rendant impossibles les conditions nécessaires au bon fonctionnement de ces appareils commerciaux, par exemple, des milieux de culture spécifique à certains traitements peuvent modifier l'indice de réfraction de la solution observée et perturber l'observation (ex : présence de glycérol). Il est donc très intéressant de disposer de méthodes d'observation automatisées et en mesure de fonctionner dans une très large gamme de conditions afin de procurer aux biologistes des outils standard et adaptables à leurs observations.

1. Contexte de l'étude

Ce travail de thèse entre dans le cadre des travaux de l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques (PMB) de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) dont l'activité de recherche est centrée sur la maîtrise de l'activité et de la viabilité de microorganismes (bactéries, probiotiques, levures, champignons filamenteux, spores) soumis à différents types de perturbations environnementales, physicochimiques et biologiques d'amplitude et de cinétique variées. Le but est donc de concevoir un outil opérationnel

¹ <http://www.nexcelom.cn/Cellometer-Auto-1000/index.php>

permettant d'extraire et de reconnaître automatiquement des éléments contenus dans les images d'analyses microbiologiques.

Les outils d'analyse d'images abordés touchent plusieurs grands domaines : l'analyse fréquentielle, la détection de formes géométriques, l'extraction de paramètres texturaux, la classification des images ou les méthodes morpho-mathématiques. Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres.

2. Plan

Nos travaux se séparent en deux parties distinctes : une première étude concerne la quantification de levures *saccharomyces cerevisiae* en présence d'un stress osmotique et une seconde s'intéresse aux modifications de structures internes de ces levures en présence de stress thermique. Notre plan se décompose en quatre chapitres. Le premier chapitre présente en détail le contexte et les problématiques, les chapitres deux et trois présentent les travaux liés au comptage des cellules et le quatrième présente les travaux de caractérisation des structures internes.

a. Chapitre 1 : Contexte et Problématiques

Nos travaux s'inscrivent à l'interface de la microbiologie et du traitement d'image. Ce premier chapitre expose dans un cadre général les problématiques des deux disciplines. Ceci permettra de cerner les besoins et les problématiques soulevées. De fait, la première partie du chapitre est entièrement consacrée à l'état de l'art sur l'observation des micro-organismes, de leur intérêt et de leur importance dans l'industrie agroalimentaire moderne ainsi que sur les moyens de les étudier.

Nous montrons ensuite l'intérêt de l'imagerie microscopique et présentons les problématiques liées au traitement des images que nous avons acquises pour les besoins des deux cas d'étude. Diverses stratégies d'analyse d'images sont développées en fonction de l'information que nous souhaitons extraire. Les leviers scientifiques sont alors mis en évidence et nous orientent sur trois axes constituant les apports de cette thèse:

- L'extraction d'objets
- L'élimination d'artefacts
- Le comptage de cellules
- L'extraction qualitative d'informations intracellulaires

b. Chapitre 2 : Identification, caractérisation et effacement d'un artefact constitutif des images

Dans ce chapitre, nous allons observer le support matériel de l'image microscopique. Ce support, une grille de comptage de Malassez, est un élément appartenant à l'image (figure 1).

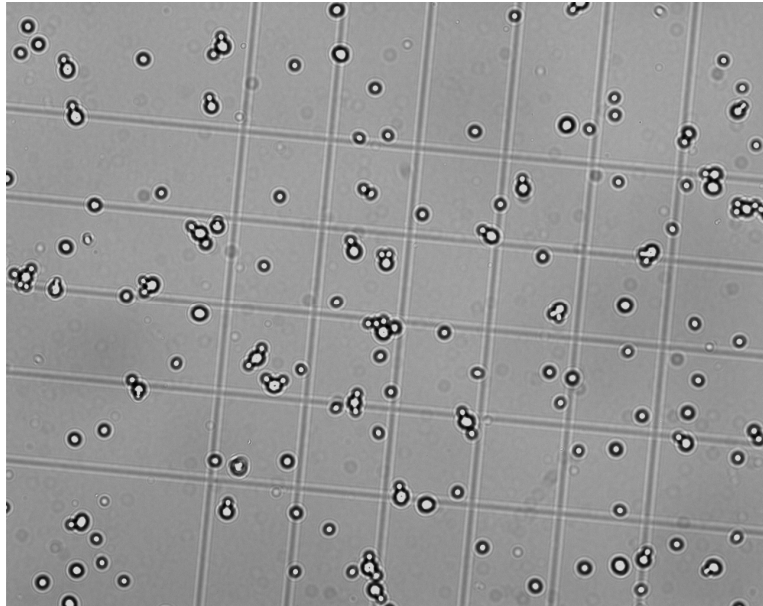


figure 1: exemple d'image de levures sur lame de Malassez

Il n'existe à notre connaissance qu'un seul travail publié sur le sujet [1], nous reprenons cette méthode pour l'étude de la grille et évaluons ses avantages et ses inconvénients. Ayant déterminé qu'il était possible de faire mieux, nous présentons tout d'abord les deux outils de base que nous avons utilisés dans ce chapitre :

- La transformée de Fourier,
- La transformée de Hough linéaire.

Nous présentons ensuite l'étude de la grille que nous avons décomposée en trois parties :

L'identification : Nous entendons par « identification » le fait d'être capable de déterminer, dans le domaine image, quels sont les pixels qui appartiennent à la grille, et par exclusion, quels sont les pixels qui appartiennent à la scène observée.

La caractérisation : La grille étant identifiée, sa caractérisation consiste à l'évaluation des paramètres mathématiques permettant de parfaitement la décrire dans l'image. En substance, il s'agit de réduire la grille à un ensemble d'équation de droites, chaque droite définissant un des barreaux de la grille.

L'effacement : il s'agit ici de séparer la grille de la scène observée. Le résultat voulu est une scène dans laquelle la grille semblerait ne jamais avoir existé, afin de faciliter l'étape suivante qui consiste au comptage des cellules présentes.

Nous concluons ce chapitre en présentant les résultats obtenus sur les images acquises pour notre cas d'étude et en évaluant leur qualité.

c. Chapitre 3 : Comptage cellulaire

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser au dénombrement des cellules présentes sur la grille de comptage de Malassez (figure 1). Il existe déjà des appareils de comptage optique ainsi que des algorithmes de détection de cellules mais ceux-ci manquent d'automatisation et de robustesse. Nous nous sommes donc orientés sur l'optimisation des méthodes existantes pour la détection de formes circulaires ou pseudo-circulaires.

Nous commencerons par présenter un outil fondamental dans la détection de cercle, la transformée de Hough circulaire, et une variation sur laquelle nous nous sommes basés, la transformée de Hough circulaire par gradients.

Dans la démarche d'optimisation de la transformée de Hough circulaire par gradients, nous avons créé deux nouvelles structures de données afin de permettre une meilleure analyse de la matrice d'accumulation qui est un des éléments caractéristiques d'une transformée de Hough ; ces deux structures sont nommées :

- **LCL** (« *Local Contributors List* ») : Cet ensemble de listes a pour but de mémoriser les origines de chaque point de l'accumulateur de sorte de pouvoir affiner l'interprétation de chaque pic mais aussi de pouvoir affiner la détection de tous les pics.
- **UCM** (« *Used Contributors Matrix* ») : cette matrice permet l'analyse fine de chaque cercle détecté et en particulier, de diminuer drastiquement le nombre de faux positifs.

En nous reposant sur une détection efficace des paramètres de la grille, nous pouvons alors présenter des résultats de comptage sous forme d'une concentration cellulaire.

d. Chapitre 4 : Caractérisation de structures intracellulaires : estimation du nombre d'agrégats ribo nucléoprotéiques (RNPs)

Après avoir caractérisé le support de comptage puis compté le nombre de cellules, nous nous intéressons spécifiquement à ces cellules. L'observation des RNPs est réalisée grâce à la

fluorescence en utilisant la technique de microscopie biphotonique (figure 2). Dans la première partie de ce chapitre, nous présentons le principe de la fluorescence et nous revenons sur la technique de microscopie biphotonique ainsi que sur son intérêt dans l'observation de cellules vivantes.

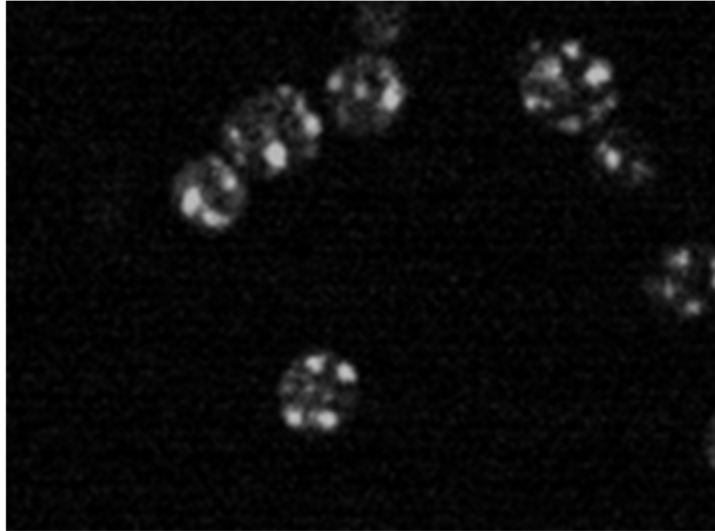


figure 2:Extrait d'une image en microscopie biphotonique de saccharomyces cerevisiae ayant développé des RNPs suite à un stress thermique

S'intéresser à chaque cellule individuellement est une observation qui, compte tenu de leur très grand nombre, est quasi impossible d'effectuer manuellement, qui plus est, dans un laps de temps raisonnable. Une étude complémentaire a amené au constat qu'il est très difficile, sinon impossible, de déterminer un comptage précis du nombre de RNPs. Nous nous sommes attachés à étudier la faisabilité d'une méthode capable d'estimer le nombre de RNPs avec des résultats les plus proches possibles de ce que feraient des experts.

Nous présentons les outils spécifiques que nous avons utilisés :

- Les ensembles de paramètres permettant la description de texture,
- Les méthodes de classification usuelles, en nous concentrant particulièrement sur la classification ascendante hiérarchique et l'analyse discriminante linéaire.

Le laboratoire ne dispose pas d'un appareillage permettant d'obtenir à la fois l'image en fluorescence et l'image en lumière blanche (transmission) qui permettrait d'identifier clairement chaque cellule individuellement. Nous avons donc séparé cette étude en deux parties :

1) **Lorsque la fluorescence diffuse était suffisante** pour segmenter correctement les cellules, nous avons utilisé une approche « perceptive » basée sur trois critères texturaux. Nous allons donc présenter dans cette partie :

- La méthode employée pour la segmentation des cellules,
- La définition des ensembles de cellules qui nous ont servi de référence,
- Une étude de faisabilité pour l'estimation du nombre d'agrégats à l'aide de méthodes de description de texture et d'images de cellules synthétiques,
- L'application au cas réel,
- Une étude de robustesse des modèles proposés.

2) **Lorsque la fluorescence permettait de n'identifier que les RNPs**, la segmentation de ceux-ci a été facilitée. Nous proposons dans un premier temps, la méthode de segmentation que nous avons utilisée en faisant un point particulier sur la méthode de ligne de partage des eaux (Watershed) utilisée et sur les ajustements effectués pour obtenir un résultat correct.

La problématique vient essentiellement de l'absence des images en transmission et nous avons donc étudié le moyen d'associer ces RNPs à des cellules non identifiées. Nous proposons donc une adaptation de la méthode de classification hiérarchique afin de regrouper les RNPs dans des cellules « virtuelles » les plus pertinentes possibles.

Chapitre 1 : contexte et problématiques

1. Problématique biologique

La microbiologie correspond au domaine des sciences appliquées qui a pour objet l'étude des micro-organismes et les activités qui les caractérisent. Plus précisément, la microbiologie se consacre à leur identification, leur caractérisation, mais également à l'étude de leur origine, de leur évolution ainsi qu'aux produits de leurs activités et leurs besoins. L'objectif principal des biologistes étant de comprendre les relations qu'ils entretiennent entre eux et avec leur milieu naturel ou artificiel². Comprendre comment sont organisées les composantes des cellules vivantes et comprendre leur fonctionnement au niveau moléculaire constitue le défi scientifique des dix à vingt années à venir. Cette connaissance est indissociable de la compréhension des processus fondamentaux de la vie.

L'analyse scientifique de ces relations nécessite inévitablement la prise en compte de l'échelle spatiale à laquelle on l'étudie. Cette notion d'échelle est essentielle en microbiologie puisque les micro-organismes sont par définition invisibles à l'œil nu. L'évolution des travaux et des découvertes en microbiologie a de fait toujours été liée très directement avec l'évolution des techniques d'observation microscopique. Aider les biologistes à comprendre les mécanismes de la vie à cette échelle est donc une des responsabilités de la microscopie dans sa définition la plus large.

La microscopie ouvre les portes d'un univers parallèle à notre monde de tous les jours. Le pouvoir de définition de notre œil a des limites physiques insurmontables, il est physiquement impossible pour un être humain de distinguer des détails de taille inférieure au 1/2 ou au 1/4 de millimètre. L'homme a raisonnablement pressenti l'existence de ce minuscule univers et a cherché durant longtemps à l'observer et c'est au 17ème siècle que des privilégiés arrivent à mettre au point les premiers outils permettant d'entrouvrir les portes de ce monde.

² <https://fr.wikipedia.org/wiki/Microbiologie>

a. Pourquoi étudier les micro-organismes, historique rapide et intérêt en agroalimentaire

Les recherches sur les micro-organismes trouvent leurs origines dans les travaux d'Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) [2]. Ces derniers sont fondateurs dans plusieurs domaines. En effet, au cours de ses travaux il développe des techniques de fabrication de lentilles optiques qui lui permettent de mettre au point le premier dispositif optique vraiment fonctionnel pour l'observation d'objets de petite taille. En 1677, il publie ses observations de « petits animaux » dans l'eau de pluie, de puits, de mer ou de neige. On trouve déjà dans les travaux de Van Leeuwenhoek la nécessité d'étudier les petits organismes et, pour y arriver, la nécessité de mettre au point les dispositifs d'observation.

Le système d'observation à simple lentille sphérique de Van Leeuwenhoek est performant pour l'époque (grossissement x300) car il restera le principal outil d'observation durant près de 150 ans face à la complexité des premiers dispositifs basés sur plusieurs lentilles.

Les premiers progrès en matière d'observation se fait à travers la conception des premiers doublets de lentilles achromatiques par Chester Moore Hall au milieu du XVIIIe siècle [3]. Leur utilisation pour la microscopie se fera alors au début du XIXe (Charles Chevalier en France, Charles Spencer aux Etats-Unis).

Des progrès décisifs seront réalisés par Carl Zeiss durant la seconde partie du XIXe siècle avec la mise au point d'un dispositif « illuminateur » pour éclairer de l'échantillon ainsi que la mise au point des premiers objectifs apochromatiques qui corrigent efficacement les aberrations chromatiques. Ces améliorations permettront d'obtenir des images d'une grande qualité.

A la fin du XIXe siècle, profitant d'outils d'observation de plus en plus performants, Louis Pasteur étudie les fermentations lactique et alcoolique. Il montre que ces phénomènes sont dus à l'action de micro-organismes (des levures). Les travaux de Pasteur inspirent Joseph Lister qui met au point la première méthode antiseptique en utilisant du phénol en chirurgie avec pour résultat, une réduction très importante du taux de mortalité post opération. C'est également à la fin du XIXe siècle que Robert Koch découvre et décrit le bacille de la tuberculose, lui valant le prix Nobel de médecine en 1905 et le titre honorifique de père de la bactériologie médicale (quatre postulats de Koch [4]).

Dès lors, l'étude des micro-organismes devient un enjeu scientifique majeur et l'est encore à ce jour.

Les travaux de Pasteur [5] portant sur la fermentation alcoolique lui ont permis, d'une part, de comprendre que le phénomène de fermentation est la conséquence de l'action de micro-organismes (levures de bière), mais aussi que les actions des micro-organismes pouvaient également être responsables de la dégradation des denrées. C'est dans ce cadre qu'il propose une méthode de traitement par la chaleur afin de tuer ces micro-organismes. Pasteur a néanmoins été précédé par Nicolas Appert dans la mise au point d'un traitement par la chaleur (1810, [6]). Il a été montré par la suite que la pasteurisation du vin altère ses qualités gustatives et elle a été assez rapidement abandonnée. Cependant, nous retiendrons qu'il s'agit ici de l'apparition d'un procédé agroalimentaire ayant pour but de contrôler les micro-organismes présents dans les denrées afin de garantir une meilleure conservation sans altération.

Les notions mises en avant par Pasteur et Appert permettent de séparer les micro-organismes en deux grandes classes :

- Les **micro-organismes d'intérêt**, qui vont contribuer à l'élaboration d'un produit et/ou lui donner des propriétés particulières intéressantes (conservation, modification, goût, aspect...),
- Les **micro-organismes indésirables** pouvant être à l'origine d'une dégradation ou d'une dénaturation des denrées ou de pathologies pour le consommateur.

L'étude des micro-organismes tient aujourd'hui une place centrale dans l'élaboration des procédés de l'industrie agroalimentaire.

Le premier objectif vise la sécurité sanitaire. Dans ce cas, l'industrie agroalimentaire cherche alors à éliminer systématiquement les micro-organismes pathogènes. Le second objectif concerne l'optimisation de la conservation des aliments. En effet, rappelons qu'une meilleure conservation temporelle des qualités nutritionnelles et gustatives des aliments passe nécessairement par une meilleure maîtrise du développement des micro-organismes. Par ailleurs, ceci a pour avantages de faciliter le transport et la commercialisation des produits pour les filières concernées. De fait, la plupart des procédés mis en place visent donc, sans dénaturer le produit, à détruire ces micro-organismes indésirables tout en conservant au maximum les micro-organismes d'intérêt. De même, d'autres procédés ont pour but de contrôler et stabiliser le développement de ces micro-organismes pour la conservation. Citons quelques procédés :

Procédés de destruction :

- Pasteurisation, Stérilisation, Appertisation [7],
- Ionisation[8],
- Filtration [9],
- Hautes pressions [10],
- Chocs électriques pulsés [11],
- Composés bactéricides [12],
- Compression/Décompression avec gaz soluble [13].

Procédés de stabilisation :

- Froid : blocage/ralentissement du développement des microorganismes [14],
- Action sur l'activité de l'eau [15],
- Oxydoréduction : conditionnement sous atmosphère modifiées [16],
- Substance inhibitrices : fumage [17],
- Salage/Sucrage [18].

Procédés de développement :

- Fermentation [5].
- Affinage [19]
- Culture de la spiruline [20]

Pour l'ensemble des procédés utilisés ci avant, leur efficacité est jugée de deux manières. D'une part, des études sensorielles avec pour but de déterminer les altérations en termes de saveur ou de texture. D'autre part, identifier et quantifier les micro-organismes présents après le traitement appliqué. Ceci se réalisant sur la base d'un échantillon témoin.

b. Comment étudier les micro-organismes ? Comment accéder aux données pertinentes ?

Les micro-organismes présentent une très large diversité. Des études récentes³ estiment à environ un milliard le nombre d'espèces différentes dont seulement 1% serait répertoriées (environ dix millions). L'identification des différents micro-organismes est donc un enjeu

³ <http://www.earthmicrobiome.org/>

majeur de la microbiologie dans la quête de la compréhension de la biodiversité. L'étude de ces micro-organismes est généralement réalisée en laboratoire où les conditions d'étude sont contrôlées au maximum pour ne pas perturber les mesures et maîtriser au mieux les variables étudiées. Même dans les conditions d'un laboratoire, les études sont complexes et ceci pour plusieurs raisons énumérées ci-dessous :

Le nombre de paramètres contrôlés : Une analyse en laboratoire présente exige un strict contrôle des paramètres environnementaux (pH, température, pression...). Le biologiste doit néanmoins faire face à un grand nombre de facteurs dont le contrôle n'est pas toujours assuré et doit les prendre en considération, que ce soit dans le protocole expérimental ou l'acquisition.

La complexité des variables et leurs interactions : directement liée au nombre de paramètres pris en compte (contrôlés ou observés), l'étude doit faire face à une forte complexité des variables environnementales ainsi qu'à leurs interactions. A ce niveau, les difficultés sont multiples : répertorier les nombreux facteurs principaux pouvant être considérés comme "explicatifs" dans l'étude, mais aussi éviter les facteurs confondants (ou facteurs de confusions).

La dimension temporelle : Dans le cadre d'une étude de populations de micro-organismes, il est nécessaire de réaliser des suivis dans le temps. D'une part cela permet de déterminer la stabilité et la répétitivité du phénomène étudié. D'autre part, certains phénomènes à observer sont plus ou moins rapide dans le temps.

L'étude des relations entre les micro-organismes et leur environnement constitue un des fondements de la microbiologie. Pour cela il faut donc extraire des paramètres explicatifs pertinents. Les microbiologistes ont développé, pour décrire ces relations, différentes approches que nous pouvons décomposer en deux aspects essentiels, l'étude qualitative et l'étude quantitative des micro-organismes.

i. L'étude qualitative des micro-organismes

Dans un milieu donné, il s'agit ici de déterminer quels micro-organismes sont présents. Il existe de nombreuses méthodes pour identifier des micro-organismes. Ces méthodes peuvent se baser sur les conséquences de la présence d'un type de micro-organisme donné dans un milieu spécifique, sur une identification visuelle ou encore sur une identification génétique.

L'identification des types de micro-organismes présents dans un milieu donné est un des grands enjeux de la microbiologie. Cette identification peut passer par des critères visuels tels que la

forme (sphérique, bâtonnet...) ou les caractéristiques physiques (filaments, protubérances...), [21]. Il existe également des méthodes indirectes reposant sur les conséquences de la présence d'un microorganisme spécifique dans un milieu donné (fermentation, dégagement de gaz, production de métabolites ...), [22]. D'autres méthodes utilisent la spectrométrie afin de différencier les souches présentes [23]. Les méthodes les plus sophistiquées reposent sur le séquençage ADN [24].

Le laboratoire PAM ne travaillant qu'avec des organismes clairement identifiés et avec des cultures contrôlées, nous ne détaillerons pas d'avantage ces méthodes.

ii. L'étude quantitative des micro-organismes

Il s'agit principalement de chiffrer précisément les quantités de micro-organismes présentes dans un milieu donné ou d'organites présents dans un micro-organisme. Cette quantification, et son évolution dans le temps sont les objectifs principaux de nombreuses études biologiques. Il existe de nombreuses méthodes de quantification que nous détaillerons dans ce chapitre. D'autres paramètres, tels que le volume des cellules ou leurs formes, peuvent également être étudiés quantitativement. Nous abordons ici deux quantification : le dénombrement des cellules dans un milieu et celui d'éléments cytoplasmiques.

La quantification des microorganismes présents dans un milieu est une manipulation usuelle dans toute expérience de microbiologie. Cette quantification consiste en la détermination du nombre de cellules présentes dans un volume de milieu donné. Le résultat peut être exprimé en nombre de cellules par litre ou en Unité Formant Colonie par Litre (UFC/L). Une UFC correspond à l'apparition d'une colonie lors d'un comptage par ensemencement et culture. Il faut noter que ces méthodes ne permettent de compter que les cellules viables et cultivables.

La nature microscopique des cellules implique que le comptage est fait systématiquement sur un échantillon et non sur le volume complet de matière à analyser. Dans le cas où le nombre de cellules devient trop important, la solution sera diluée afin de rendre discernables les cellules en suspension. Le résultat du comptage est ensuite extrapolé en fonction du volume de l'échantillon et de la dilution utilisée. Ce type de comptage impose des protocoles précis, une mesure précise du volume observé et des cultures parfaitement agitées (homogènes) permettant de garantir la représentativité de l'échantillon.

Il existe plusieurs méthodes de détection et de quantification des micro-organismes :

- **La quantification par culture sur boîte de Pétri**⁴ consiste à diluer la culture en veillant bien à ce qu'elle reste homogène. Il s'agit ensuite de déposer une fraction de cette culture sur un milieu gélosé puis de l'incuber pour obtenir la formation de colonies. On obtient une mesure de la quantité de micro-organismes en UFC/L. l'inconvénient de ce type de mesure est le temps nécessaire pour réaliser l'incubation avant que la lecture des boîtes ne soit possible.

La figure 3 montre une boîte de Pétriensemencée avec l'apparition de colonies de microorganismes.



*figure 3: Boîte de pétri avec des colonies de microorganismes*⁵

- **Le compteur à effet Coulter** repose sur le principe de faire passer un volume donné d'une solution au travers d'un ou plusieurs micro canaux séparant deux chambres contenant un électrolyte (figure 4). Le passage de chaque particule va alors entraîner une variation de résistance électrique et c'est en mesurant ces variations que seront déterminés le nombre de particules et leurs tailles. Le résultat est un histogramme représentant la distribution de particules en fonction de leurs tailles. L'inconvénient est qu'il n'est pas possible d'identifier précisément ce qui a été dénombré (particules, micro-organismes, débris...). Ces appareils seront présentés plus en détail page 28

⁴ <http://www.perrin33.com/tbma/comptages-ufc.html>

⁵ Cours magistral de JF. Cavin (AgroSup Dijon)

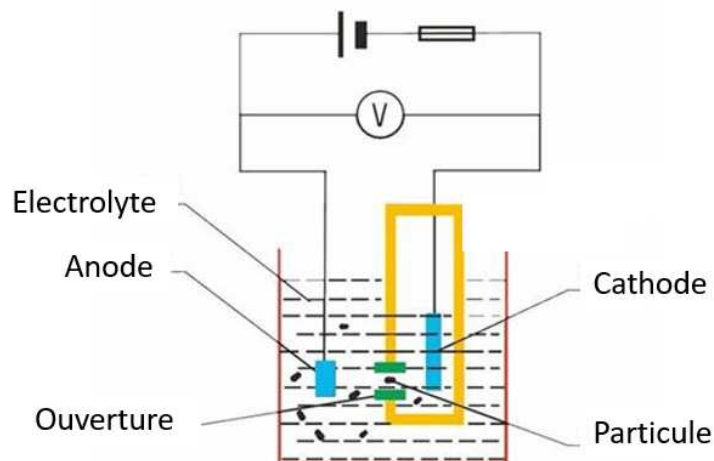


figure 4: schéma de fonctionnement du compteur à effet Coulter⁶

- **La mesure de la biomasse par mesure de densité optique** (figure 5) consiste à comparer la densité optique du milieu stérile (non inoculé) avec la densité optique du même milieu contenant les micro-organismes à quantifier. Les micro-organismes présents dans le milieu engendrent un phénomène de diffusion de la lumière les traversant. Le flux de lumière transmis à travers l'échantillon est donc de moindre intensité que le flux incident. La densité optique (DO) s'exprime alors selon la relation $DO = \log(1/T)$, T correspondant au pourcentage de lumière transmise à travers l'échantillon. Ce type de mesure permet de quantifier, après calibrage, la biomasse présente ($Biomasse = f(DO)$, f étant une fonction linéaire pour les faibles densités) mais ne permet pas d'en identifier le type, ni de savoir si les microorganismes sont en vie.

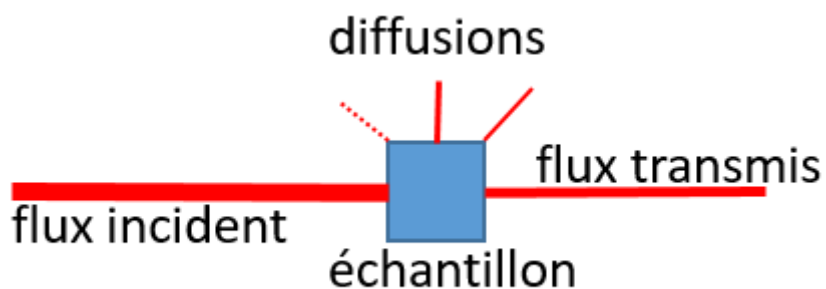


figure 5: principe de la mesure de biomasse par densité optique

⁶https://www.samhs.org.au/Virtual%20Museum/Medicine/Lab_and_other_tests_except_xray/Coulter-counter/Coulter-counter.htm

- **La cytométrie en flux (CMF)** consiste à faire défiler les particules individuellement et à haute vitesse dans le faisceau d'un laser (figure 6). La lumière émise par diffusion ou fluorescence permet de trier la population en fonction de la longueur d'onde (cellules vivantes ou mortes, par exemple) et de la quantifier. Nous présenterons plus en détail la cytométrie en flux page 30

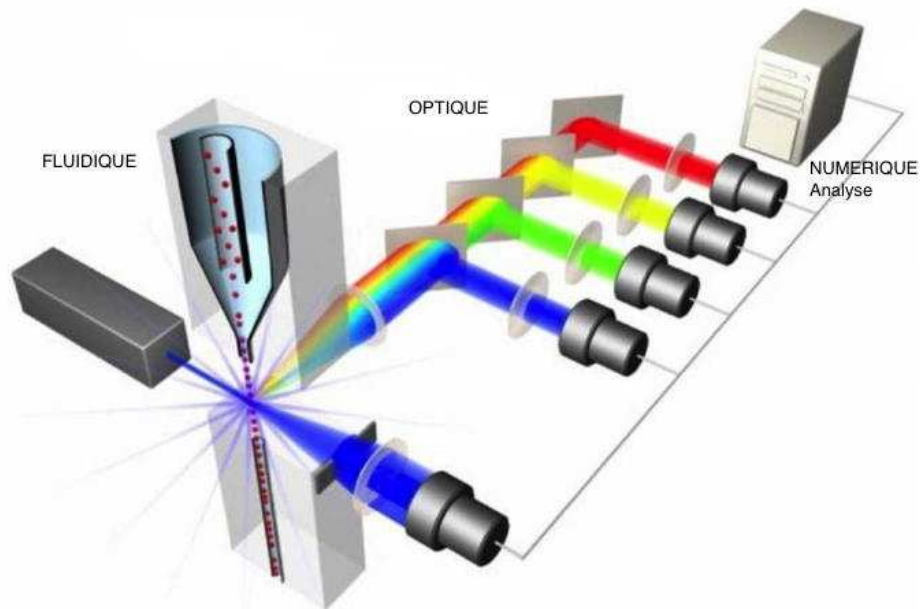


figure 6: schéma de principe de la cytométrie en flux⁷

- **Le comptage optique.** Cette approche de comptage est réalisée manuellement à l'aide d'un microscope et d'une lame spécifique permettant d'associer un volume précis au champ observé (figure 7).

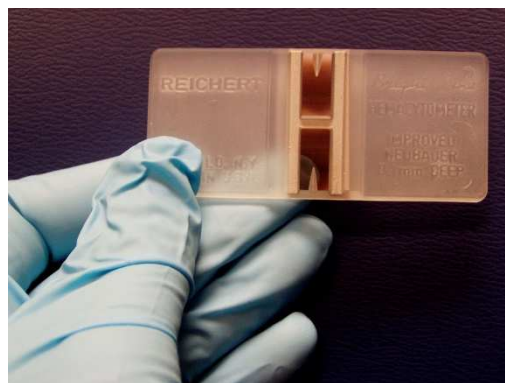


figure 7: exemple d'une lame de comptage optique⁸

⁷ <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>

⁸ <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>

Bien que les moyens d'investigation cités ci-dessus soient toujours d'actualité, ils fournissent des données soit trop précises et empreintes de subjectivité (pour le comptage manuel) soit insuffisamment détaillées car mal adaptées, soit coûteuses. Il est aujourd'hui nécessaire pour le biologiste de pallier l'ensemble des inconvénients cités précédemment. D'une part, il faut adapter l'échelle d'observation aux micro-organismes. D'autre part, il faut éliminer au maximum la subjectivité de l'observateur. Pour ce dernier point, il est nécessaire de développer des outils optiques, électroniques et numériques adaptés à l'analyse des micro-organismes.

Méthodes de comptage cellulaire

Le comptage cellulaire est une étape obligatoire, parfois fastidieuse, mais incontournable dans l'étude de cultures cellulaires. Il permet d'avoir une information quantitative sur la culture cellulaire à un temps donné. Il s'agit de déterminer le nombre de cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide. Le résultat d'un comptage est exprimé en concentration cellulaire, c'est à dire en unité d'objets par unité de volume (par ex., nombre de cellules / ml). Le comptage cellulaire s'effectue toujours sur un échantillon extrait du milieu de culture. La taille de cet échantillon étant précisément définie, le résultat obtenu est ramené au volume total pour estimer la concentration et la quantité totale, par une simple règle de trois. Le comptage cellulaire peut se faire soit **manuellement**, soit par un **comptage automatisé** avec des équipements dédiés.

Le comptage manuel

Les lames de comptage sont couramment utilisés sous l'oculaire d'un microscope pour déterminer la concentration cellulaire [25], [26] (voir figure 1, page 11). Le comptage manuel est la méthode la plus répandue dans les laboratoires car elle est facile à mettre en œuvre et nécessite peu de matériel. L'opérateur choisit de compter ou non certaines cellules en fonction de critères définis dans le cadre de l'expérience mais aussi de sa propre expérience. Pour ce comptage manuel, l'expérimentateur a besoin :

- D'une lame de comptage, dans laquelle est creusée une chambre comportant un quadrillage définissant un volume précis,
- D'une pipette pour doser précisément le volume de solution déposé sur la lame de comptage,
- D'un microscope pour l'observation,

- De tampon⁹ pour les éventuelles dilutions, si nécessaire,
- De la solution de culture pour laquelle il s'agit de déterminer la concentration cellulaire.

Les lames utilisées pour le comptage manuel sont des lames spécifiques, en verre ou en plastique. Les différents types de lames seront présentés dans le deuxième chapitre, qui s'intéressera spécifiquement aux lames de Malassez utilisées au laboratoire PAM.

Pour réaliser le comptage, un volume d'échantillon de la solution à compter (en général entre 10 et 20 μ l) est déposé entre la lame et la lamelle au niveau du quadrillage (étalement de l'échantillon par capillarité entre la lame et la lamelle). L'examineur parcourt alors la lame en respectant un itinéraire de comptage précis de manière à limiter au maximum le risque d'erreur.

Le volume défini par la grille de comptage étant connu, les cellules comptées dans le réseau déterminent directement le nombre de cellules dans la solution.

$$C \text{ (cel/ml)} = \text{Quantité de cellules} / \text{Volume (en ml)}$$

La gamme de concentration pour ce type de comptage se situe entre 250 000 et 2 500 000 cellules/ml : au-dessus de cette concentration, le risque d'erreur augmente de façon significative [27]. En dessous, l'extrapolation est faite sur une quantité de cellules trop faible pour être fiable. La concentration optimale lue avec cette méthode est de 1 million de cellules/ml.

En fonction de la confluence¹⁰ dans la suspension cellulaire, il est souvent nécessaire d'effectuer une dilution avant le comptage. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution dans le calcul de la concentration totale de la suspension cellulaire.

Une fois la solution déposée sur la lame, elle est observée sous le microscope. Après la mise au point, on compte le nombre de cellules sur quelques cadres de la lame (généralement au moins quatre ou cinq) afin de d'améliorer la précision statistique. Après le comptage, une règle de trois permet de déduire la concentration totale de cellules dans l'échantillon, suivant la formule (ici adaptée aux lames de Malassez) :

$$C = (\text{Quantité de cellules} \times 10\,000) / (\text{Quantité de cadres} \times \text{dilution})$$

⁹ Une solution tampon a pour but de maintenir le même pH lors de l'addition de petites quantités d'un acide ou d'une base

¹⁰ La confluence est un terme de culture cellulaire qui décrit le degré d'écartement entre cellules.

Ce type de comptage manuel est facile à mettre en place dans un laboratoire mais présente néanmoins des limites, en particulier, les résultats varient d'un utilisateur à l'autre. Pour illustrer les variations des résultats obtenus, la figure 8 montre l'analyse en composantes principales de comptages réalisés manuellement sur un échantillon de treize images, issues des 137 acquisitions de l'expérience sur le stress osmotique (premier cas d'étude), par quatorze opérateurs au sein du laboratoire (projection sur les deux premiers axes factoriels).

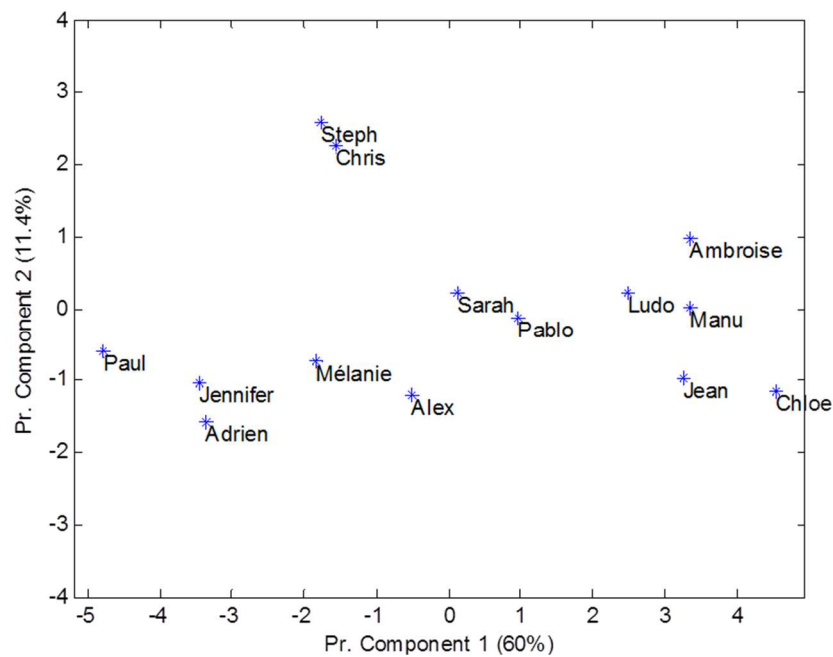


figure 8 : Analyse en composante principale des comptages manuels.

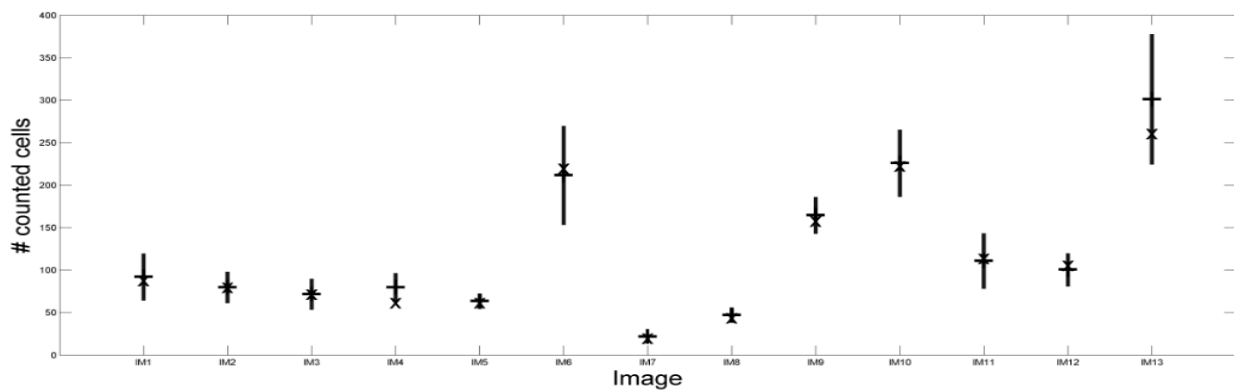


figure 9: résultats des comptages réalisés sur un échantillon de 13 images par 14 volontaires. La longueur de chaque segment est égale à l'intervalle de confiance à 95% pour l'image concernée

La figure 8 permet donc de mettre en évidence la subjectivité de l'expert : lors des comptages, faire la distinction entre un débris, une particule ou une cellule s'avère parfois très difficile et ces critères varient beaucoup d'un opérateur à un autre. Ces variations dépendantes de

l'opérateur lors du comptage manuel conduisent à d'importants écarts types dans les résultats obtenus qui sont illustré par la figure 9. L'erreur moyenne des comptages manuels est d'environ 20%, par exemple, pour une image comptant 300 cellules, les résultats manuels varient entre 240 et 360.

La méthode de comptage manuelle qui représente aujourd'hui notre référence est donc peu reproductible d'une lame à une autre ou d'un utilisateur à un autre. Cela nécessite aussi la possibilité de partager les observations de la culture, ce qui n'est pas toujours le cas dans les laboratoires.

Le recours aux comptages manuels a aussi **un coût temporel et humain** : lorsque l'étude se fait sur un grand nombre d'images, les opérations de comptage font peser une charge importante sur les ressources humaines d'un laboratoire. Cela a un coût humain et indirectement financier, ce qui peut devenir rapidement un facteur limitant.

Si la prise manuelle d'image sous microscope est incontournable, en revanche, le comptage lui-même à partir des images peut être partiellement ou complètement automatisé.

Le comptage automatisé

Pour garantir une reproductibilité de comptage, réduire la variabilité des résultats liés à l'utilisateur et gagner du temps, des systèmes de comptage automatisés ont été développés. Ces systèmes sont plus ou moins complexes et précis selon les modèles, mais également plus ou moins adaptés suivant les besoins expérimentaux. Ils fonctionnent tous selon un principe équivalent au comptage manuel : un échantillon de volume connu, une détection automatique des cellules et un calcul de la concentration finale. À titre d'exemple, nous pouvons citer les types d'appareils suivants :

➤ Le compteur de cellules portatif

Ce type de compteur ressemble à une pipette et est basé sur le principe Coulter, voir figure 10.



figure 10 une pipette de comptage de la marque Scepter basée sur le principe Coulter¹¹

¹¹http://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/Scepter%E2%84%A2-2.0-Handheld-Automated-Cell-Counter,MM_NF-C85360

Le principe Coulter a été développé par Wallace H. Coulter en 1940. Il permet le comptage et la détermination la taille des particules en se basant sur une mesure d'impédance. Cette technologie a principalement été créée pour compter rapidement des cellules sanguines en mesurant les modifications de conductance électrique lors du passage de ces cellules en suspension dans un fluide conducteur à travers un petit orifice, voir figure 4.

Sur le compteur de cellules, l'utilisateur installe à l'extrémité de la pipette une sonde, puis va pipeter directement 50 μ l de sa suspension cellulaire préalablement diluée si nécessaire. La suspension entre dans la pipette puis est envoyée dans un microcapillaire situé au niveau de la sonde qui détecte chaque cellule. Le système intégré détermine la concentration cellulaire est affichée sur l'écran de la sonde (cf. photo ci-dessus figure 10) avec un histogramme montrant la distribution des tailles des cellules.

Ce compteur automatisé est pratique car rapide et portable. Cependant, il reste très limité en termes d'application car il est impossible de vérifier la fiabilité des résultats obtenus. En effet, l'utilisateur n'a aucun moyen de vérifier si les cellules comptées ne sont pas des débris ou des « groupes » de cellules. Il n'a également aucun moyen de réajuster le comptage ou de recompter le même échantillon à la différence d'autres compteurs automatisés (cf. Cellometer® paragraphe suivant). Le prix de ce genre de dispositif avoisine les 3000€.

➤ *Compteurs automatisés avec imageurs*

Certains compteurs automatisés disponibles sur le marché utilisent du bleu de Trypan pour augmenter le contraste cellules/fond. Ils possèdent une caméra CCD, un logiciel de traitement des résultats. L'échantillon est aspiré ainsi que le bleu de Trypan, puis le mélange est injecté dans **le système fluide** et passe à travers une cellule optique qui permet de capter une image de la suspension cellulaire.

La suspension apparaît à l'écran, l'opérateur effectue alors la mise au point sur les cellules et lance le comptage automatisé (figure 11). L'opérateur observe qualitativement ses résultats et peut choisir de les refaire pour vérifier leur reproductibilité, ou bien effectuer des modifications de paramètres pour optimiser le comptage. L'acquisition porte sur une centaine d'images qui déterminent le nombre de cellules, la concentration et la viabilité de l'échantillon. Les données obtenues sont des résultats numériques, des histogrammes de distribution des tailles de cellules et des images des cellules. Le fait de visualiser les cellules après comptage permet de s'assurer que le dispositif n'a pas compté de faux positifs ou des débris cellulaires. En plus des données quantitatives, l'utilisateur a accès à des données qualitatives (viabilité, taille, forme...). Pour

ces compteurs, le volume d'échantillon utilisé peut devenir assez important (environ 500 μ l) auquel il faut ajouter le volume mort et le volume de nettoyage du système fluide. Ce dispositif est donc gourmand en solution tampon et en échantillon.

De plus, le système fluide exige des étapes de nettoyage très importantes pour écarter tout risque de contamination.



figure 11 Cellometer Auto 1000¹²

L'ajout de données qualitatives (visuels, images des cellules comptées, histogramme, viabilité ...) aux données quantitatives rend ce type de comptage attractif avec comme avantages : gain de temps, reproductibilité, qualité des résultats.

Cependant, l'aspect « automatique » de ce type d'appareils n'est pas complet : l'opérateur effectue la mise au point et observe qualitativement ses résultats puis peut choisir de refaire, au besoin, un comptage.

Les avantages liés à l'utilisation de ce type de matériel ne sont accessibles que dans une plage d'utilisation précise et avec des protocoles strictement définis qui permettent de s'affranchir au maximum les difficultés liées au traitement de l'image. Le cadre d'utilisation de ces appareils les rend donc peu adaptés aux conditions expérimentales particulières. Le prix est également un paramètre à prendre en compte car ce type de matériel coûte encore relativement cher (environ 10 000€).

➤ *La cytométrie en flux*

La cytométrie en flux (CMF) est définie comme l'étude de cellules isolées **entraînées par un flux liquide**. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de

¹² <http://www.nexcelom.cn/Cellometer-Auto-1000/index.php>

particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou électromagnétiques émis par une particule coupant un faisceau lumineux, d'un laser par exemple.

La CMF est la combinaison de trois technologies :

- La micro-fluidique pour introduire et canaliser les cellules,
- L'optique en tant que source d'excitation et de récupération des signaux lumineux,
- L'électronique pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur.

Les signaux mesurés sont liés aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à sa structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules vivantes. Pour les applications en microbiologie, la CMF permet de mesurer la fluorescence obtenue par marquage spécifique d'une structure ou d'une fonction cellulaire.

Ce procédé d'analyse cellule par cellule est multiparamétrique et peut s'effectuer à haute vitesse (plusieurs milliers d'évènements par seconde). L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes ou de cytogrammes (figure 12) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. Les cytomètres en flux les plus évolués permettent de trier physiquement plusieurs populations cellulaires en fonction de leurs propriétés optiques.

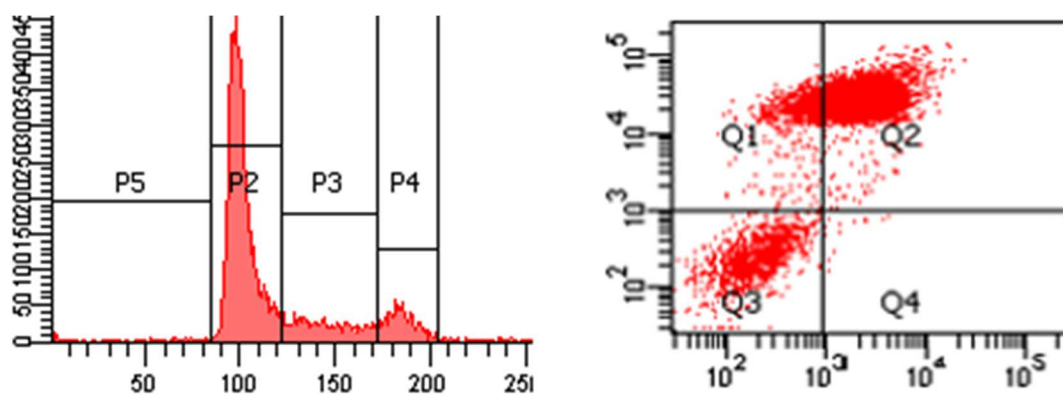


figure 12: Exemple d'histogramme (gauche) et de cytogramme (droite) produit par CMF¹³

¹³ <https://biologie.chu-grenoble.fr/plateforme-de-cytometrie-en-flux>

La mesure des propriétés optiques des cellules nécessite de les faire circuler une par une devant le capteur. Cette circulation est obtenue en utilisant un centrage hydrodynamique dont le principe est d'amener les cellules au centre de la buse de mesure et en les alignant les unes derrière les autres. L'échantillon est plongé dans un liquide de gaine qui subit une accélération progressive afin d'étirer l'échantillon et d'aligner les cellules au centre du jet (figure 13).

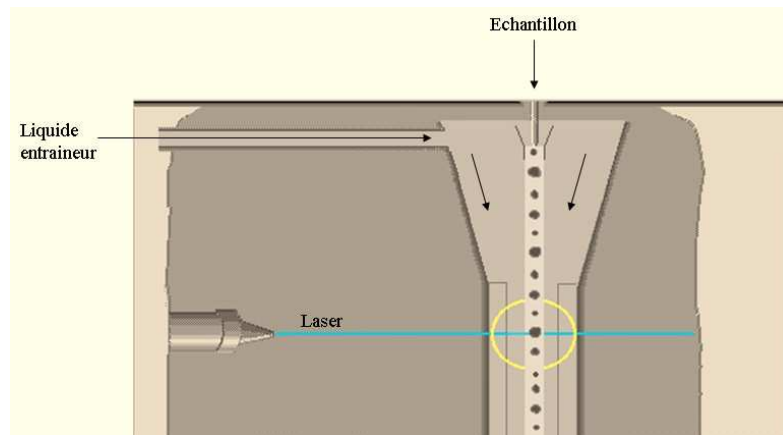


figure 13 Principe du centrage hydrodynamique¹⁴

La CMF offre de nombreux avantages dans le domaine de l'étude cellulaire par rapport aux techniques précédentes. [28]. Nous pouvons citer :

- Vitesse d'analyse (jusqu'à 100 000 évènements/s),
- Mesures individuelles sur un grand nombre de cellules,
- Analyse simultanée de paramètres multiples,
- Identification et tri de populations hétérogènes.

Cette technologie présente tout de même un certain nombre d'inconvénients parmi lesquels [28] :

- Coût, environ 50 000€,
- Manipulation par un spécialiste hautement qualifié,
- Micro-fluidique sensible (bouchage), la solution doit avoir une fluidité optimale,
- Aucune information sur l'organisation intercellulaire,
- Très peu d'informations sur les distributions intracellulaires,
- Le nombre de cellules doit être de l'ordre de quelques centaines de milliers au minimum.

¹⁴ <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>

iii. Intérêt de l'imagerie microscopique pour la microbiologie

L'imagerie de microscopie offre aujourd'hui de puissants moyens d'investigation pour observer les micro-organismes et en extraire des paramètres pertinents. En plein essor depuis quelques décennies, le domaine de la microscopie offre le choix de nombreux modes d'acquisitions (nuances de gris, couleur, multi/hyperspectral, fluorescence, 3D, ...) avec des résolutions et des caractéristiques adaptées en fonction des problématiques biologiques. Les figure 14, figure 15 et figure 16 montrent des exemples d'images obtenues avec différentes technologies de microscopie.

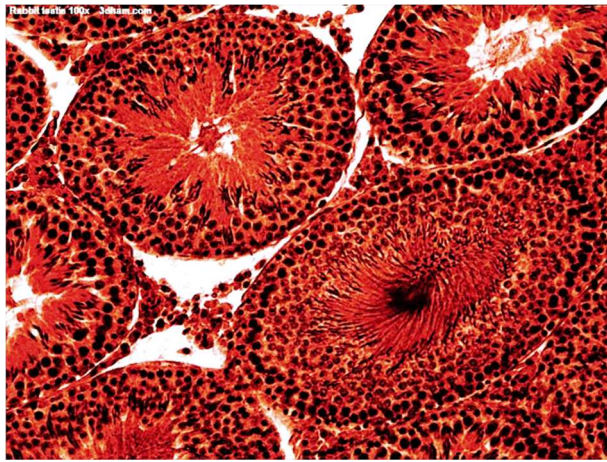


figure 14: exemple d'image en microscopie optique (cellules de lapin)¹⁵

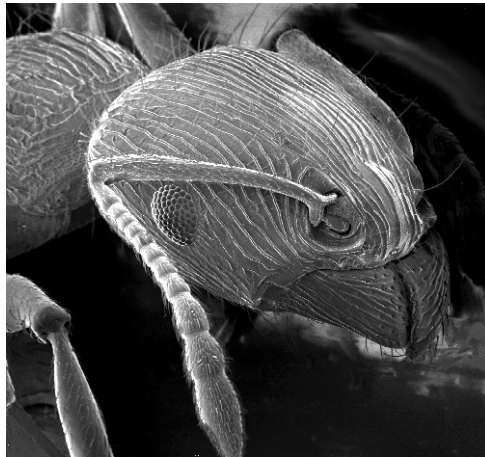


figure 15: exemple d'image en microscopie électronique à balayage (tête de fourmis)¹⁶

¹⁵ <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/72/Rabbitttestis100x2.jpg>

¹⁶ https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/ca/Ant_SEM.jpg

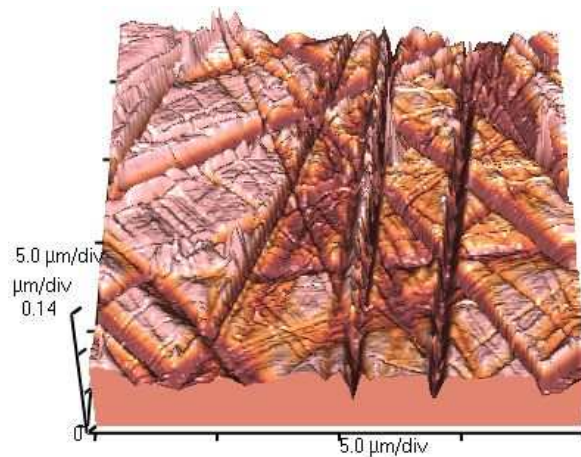


figure 16: exemple d'image en microscopie à force atomique (surface vitrée)¹⁷

Parmi les nombreuses possibilités, l'expert doit faire de multiples choix : type d'image, échelle d'analyse, stratégie à adopter en fonction de l'objectif (comptage, détection, caractérisation, ...). Il est tout d'abord indispensable dans une étude de microbiologie de définir l'objet à observer ainsi que son environnement. S'agit-il de d'une population de cellules, d'une cellule, des éléments internes de la cellule ? En effet, ces contraintes orientent directement l'expert vers le choix du type d'image et donc du microscope (technique d'observation et grossissement) et du capteur associé. Durant nos travaux, nous avons travaillé à deux échelles : d'une part, à l'échelle de la lame d'observation avec pour but d'évaluer (par comptage) la quantité de cellules et d'autre part, à l'échelle de la cellule avec pour objectif de quantifier le nombre d'agrégats ribo nucléoprotéiques. De fait, nous observerons que le choix des images se fait directement en fonction de la problématique microbiologique.

Les outils d'imagerie présentent de nombreux avantages :

- Ils permettent de **spatialiser l'information**. Une image contient l'information de positionnement des éléments. Dans le cas de micro-organismes, les positionnements relatifs des uns par rapport aux autres peuvent s'avérer être une information importante. Dans certaines études, il sera, par exemple intéressant de caractériser des comportements d'agrégation ou de cohésion des micro-organismes. Cette spatialisation de l'information permet également l'utilisation de descripteurs basés sur les voisinages, tels que les descripteurs texturaux par exemple. L'utilisation de boîtes de Pétri, de

¹⁷ <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e8/AFMimageRoughGlass20x20.JPG>

compteurs à effet Coulter, de la cytométrie ou des méthodes de densité optique ne permettent pas cette spatialisation des informations.

- Ils peuvent permettre d'utiliser une information **colorimétrique ou multispectrale** en fonction du capteur utilisé pour l'acquisition. Cette information s'avère souvent très intéressante en microbiologie, avec l'utilisation de colorants permettant de distinguer les cellules vivantes et mortes ou encore avec l'intégration d'éléments fluorescents émettant dans des longueurs d'onde distinctes, permettant de distinguer diverses molécules.

Les informations colorimétriques et/ou de fluorescence sont également disponibles avec la cytométrie mais elles ne sont en revanche pas exploitables avec les boîtes de Pétri, les compteurs à effet Coulter ou les méthodes de densité optique.

- Les outils d'acquisition d'image sont également souvent assez **simples à mettre en œuvre** (comparativement aux autres méthodes) et permettent de ce fait d'obtenir un résultat rapidement et sans nécessiter l'emploi d'experts spécialisés. Pour la plupart des applications, la préparation de l'échantillon pour une observation sous microscope est assez triviale. A part pour les techniques de pointe telles que la microscopie électronique ou la microscopie biphotonique, la préparation et l'observation peut être confié à des opérateurs n'étant pas spécialisés. Cette relative simplicité de mise en œuvre se retrouve avec les boîtes de Pétri, les compteurs Coulter ou les méthodes de densité optique, en revanche, l'utilisation de la cytométrie en flux est plus complexe et requiert une très forte expertise de l'opérateur.

Les méthodes d'imagerie microscopique présentent donc de nombreux avantages qui les rendent adaptées ou adaptables à un très large panel de problématiques microbiologiques. Nous pourrions les qualifier de « tout terrain ». Ces méthodes d'imagerie, s'appuyant sur de nombreuses technologies avancées en microscopie, permettent une fine observation des micro-organismes.

2. L'imagerie microscopique

Depuis les premiers instruments mis au point par Antoni Van Leeuwenhoek aux XVII^e siècle, l'observation des phénomènes microscopiques a fait d'immenses progrès. Il existe aujourd'hui de multiples techniques de microscopie adaptées pour les observations de scènes vivantes ou inertes à différentes échelles, allant de l'observation d'échantillons de populations de micro-

organismes disposés sur des lames de verre jusqu'à l'observation d'atomes grâce aux techniques de microscopie à effet tunnel [3]. Chaque technique permet d'observer des phénomènes particuliers et visibles uniquement à une échelle précise.

Il est essentiel d'être en mesure d'enregistrer les observations et dès l'utilisation des premiers instruments, les scientifiques ont eu pour but de les capturer. Dans les premiers temps, en l'absence de dispositif automatisé, la qualité de cette capture s'est essentiellement reposée sur le talent d'illustrateur de l'observateur (figure 17).

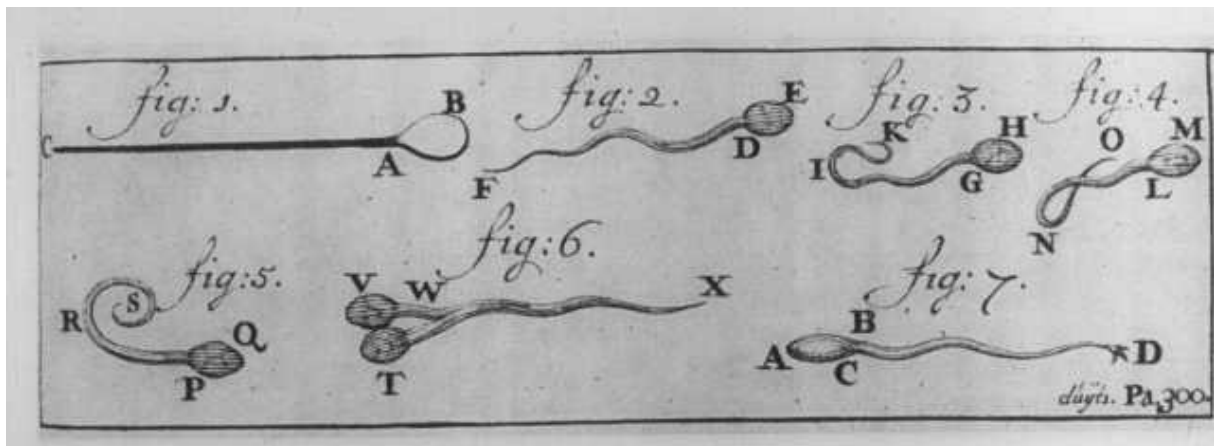


figure 17: illustration de spermatozoïdes par Antoni Van Leeuwenhoek¹⁸

Ces illustrations manuelles ont été rapidement abandonnées lors de l'invention de la photographie permettant une capture « papier » objective de la scène observée et un partage facilité au sein de la communauté scientifique. Néanmoins, si la photographie fût un progrès indéniable, l'apparition des caméras permettant un enregistrement en format numérique est une révolution qui permet aujourd'hui de conserver, dupliquer, partager les observations très facilement. De ce fait, l'imagerie numérique, et en particulier microscopique, est aujourd'hui un outil des plus précieux pour la communauté scientifique. L'enjeu pour le traiteur d'image est donc d'extraire un maximum de variables qualitatives et quantitatives de ces observations afin de permettre au microbiologiste de répondre à ses questions.

a. Généralités sur l'image numérique

Une image numérique est une matrice de valeurs représentant une scène point par point. Chaque case de cette matrice (pixel) et représente une zone de la scène originale projetée sur un plan

¹⁸ <http://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/leeuwenhoeck.htm>

d'observation. La valeur de chaque pixel, qui correspond à une moyenne du signal reçu pour la zone correspondante de la scène, peut être représentée en utilisant différents codages permettant de décrire une image binaire, en nuance de gris, en couleur ou même multispectrale [29]. Une image numérique contient donc ces données matricielles représentant la scène mais intègre également une certaine quantité de données informatives, appelées métadonnées, renseignant les paramètres d'acquisition de l'image. Ces métadonnées sont souvent essentielles pour la compréhension de l'image en elle-même, à savoir, par exemple, ce que représentent les valeurs enregistrées dans la matrice ou à quelle date l'image a été acquise.

Une image numérique est la représentation discrétisée d'une scène continue, en d'autres termes, dans une image numérique, chaque pixel enregistre une moyenne sur une zone captée et par conséquent, il n'existe pas d'objets continus au sens mathématique dans l'image. La nature discrète de l'image rend nécessaire l'adaptation de l'ensemble des méthodes d'analyse mathématique que nous pouvons être amenés à employer. Il s'agit là d'un des problèmes majeurs que nous avons rencontrés au cours de nos travaux. Par exemple, le calcul d'un gradient ou la reconnaissance d'une ligne ou d'une forme dépend directement de la résolution spatiale.

b. Outils d'acquisition

Nous nous intéresserons uniquement aux systèmes d'imagerie numérique permettant de capturer des scènes microscopiques, ce sont ces systèmes que nous allons décrire maintenant.

L'acquisition d'une image microscopique numérique requiert plusieurs éléments :

- **Une source lumineuse** : elle peut être naturelle ou artificielle, polarisée ou non. Le spectre de la source lumineuse véhicule l'énergie de base qui permettra de capturer l'image.
- **Une scène** : le ou les objets à observer. Dans le cadre de l'imagerie microscopique, si certaines techniques avancées nécessitent des dispositifs spécifiques (microscopie électronique, par exemple), la plupart du temps, la scène sera disposée sur une lame de verre. Le plus souvent, la scène sera traversée par la lumière émise par la source lumineuse. Les principales informations fournies par la scène via le dispositif seront ses spectres de transmission, d'absorption et de réflexion, c'est-à-dire, la part des longueurs d'ondes de la lumière incidente qui sera observable via le système optique et la part qui sera absorbée ou réfléchi.

- **Un système optique** : le système optique du microscope est généralement constitué de deux éléments, un objectif qui effectue le grossissement et l'oculaire qui permet d'observer la scène.
- **Le capteur** (matrice de capteurs individuels) est un élément qui permet, grâce à l'effet photoélectrique, de convertir l'image de la scène en un signal électrique. La technologie employée pour le capteur détermine en partie la qualité de l'image numérique finale. Le capteur présente des caractéristiques physiques telles que la surface exposée, la résolution et la sensibilité mais il peut également être « noir et blanc » ou « couleur ».
- **Un système de traitement** : il s'agit de l'électronique directement associée au capteur pour son exploitation. Le système de traitement a pour but de numériser l'information capturée (conversion analogique-numérique). L'électronique du système de traitement détermine l'échantillonnage du codage lors de la numérisation de l'image. Il est important d'être vigilant car certains systèmes de traitement effectuent des opérations plus ou moins complexes sur le signal issu du capteur, par exemple, l'ajustement du gain (amplification du signal). Une autre opération courante concerne l'interpolation pour les capteurs équipés de filtres pour délivrer une information « couleur ».

Il convient de choisir très précautionneusement chacun de ces éléments en fonction de la problématique à traiter.

c. Les problèmes liés aux outils d'acquisition

Dans cette section, nous présentons les points d'attention principaux concernant chaque élément de la chaîne d'acquisition d'image. Pour obtenir des acquisitions correctes et être en mesure d'interpréter correctement leur signification, il est important, à chaque niveau, de sélectionner le matériel adapté et de le paramétrer ou de le préparer correctement.

i. L'illuminant

Pour la microscopie en transmission, le spectre de la lumière incidente sera en partie absorbé par la scène qu'elle traverse, le reste étant la partie visible par l'observateur. Il est important de disposer d'une source lumineuse adaptée à la scène à observer, en particulier pour en distinguer les détails. Il faudra souvent veiller à éviter le phénomène de métamérisme [30] qui intervient lorsque le spectre de la source lumineuse ne couvre pas l'ensemble des spectres d'absorption des éléments de la scène, en utilisant une source lumineuse avec un spectre adapté.

Les longueurs d'onde utilisées pour l'éclairage de la scène ont aussi une grande influence sur le pouvoir séparateur d'un microscope. En lumière visible, par exemple, même avec un système optique parfait, il ne sera pas possible d'observer des détails d'une taille inférieure à $0.2\mu\text{m}$.

Un cas particulier concerne la fluorescence et sera abordé plus en détail dans le quatrième chapitre de ce manuscrit. Dans le cas d'une observation faisant intervenir la fluorescence, la scène est éclairée avec une longueur d'onde précise à laquelle elle réagit en émettant une nouvelle longueur d'onde spécifique.

L'obtention d'une acquisition correcte nécessite donc d'avoir une bonne maîtrise de l'illuminant. Il est important que celui-ci soit le plus uniforme possible, dans les domaines spatial et spectral.

ii. La scène

Pour obtenir une bonne image, compte tenu de la très faible profondeur de champ de la plupart des systèmes optiques, il est nécessaire que la scène soit plane et d'une très faible épaisseur : dans la plupart des cas, ce résultat est obtenu en utilisant une lamelle, mais lors de l'observation à l'aide d'une lame de comptage, il sera indispensable de laisser les cellules sédimenter le temps nécessaire, variable en fonction de la viscosité de la solution, afin qu'elles se présentent le plus possible dans le même plan.

Pour certaines images microbiologiques, il est également possible de faire appel à des colorants afin de distinguer différentes parties d'un échantillon, par exemple, on peut utiliser du bleu de méthylène pour distinguer des cellules vivantes de cellules mortes. On pourra également améliorer l'observation des cellules en faisant appel à des souches mutantes devenues fluorescentes.

La qualité de la préparation de la scène influe donc directement sur les détails qui seront observables. Cette préparation est donc une étape importante pour obtenir des acquisitions de qualité.

iii. L'optique

Par définition, la microscopie a pour but de fournir de grandes images de scènes minuscules. Un très fort grossissement est donc requis et entraîne de fortes déviations des rayons lumineux. La performance du système optique employé est donc un élément clé de la qualité du microscope. Cette performance se mesure par le rapport entre le grossissement et la quantité de

lumière captée (ouverture). La forme et la précision du polissage des lentilles influent directement sur la précision du positionnement de leurs foyers et sur les déformations occasionnées par leur usage. On parle alors d'aberrations géométriques ; celles-ci peuvent être de différentes natures (aberration sphérique, coma, astigmatisme, distorsion...) et, sans rentrer dans le détail, on retiendra que, dans tous les cas, l'image d'un point sera une tache dans le plan focal où est positionné le capteur. Ce type d'aberration peut être diminué en utilisant des courbures de lentille adaptées et en utilisant des procédés de fabrication et de polissage extrêmement précis. Les rayons lumineux de différentes longueurs d'onde sont également déviés différemment par une lentille traditionnelle. On parle alors d'aberration chromatique. Ce type d'aberration est généralement corrigé en utilisant des doublets ou des triplets de lentilles possédant des indices de réfraction différents et permettant de limiter au maximum l'effet de dispersion des foyers pour chaque longueur d'onde. On parlera de systèmes optiques achromatique (doublet) ou apochromatiques (triplet), ces derniers étant les plus complexes mais également les plus performants.

Lors d'une acquisition, il est donc important d'utiliser un système optique de qualité, limitant ainsi les aberrations, mais il est également primordial d'en maîtriser les réglages qui ont des répercussions directes sur l'ensemble de la chaîne d'acquisition. En particulier, le réglage de l'ouverture qui influe directement sur la profondeur de champ mais également sur la quantité de lumière captée et donc, sur le temps durant lequel le capteur devra être exposé pour obtenir une image et/ou sur l'amplification nécessaire.

iv. Le capteur

Il existe deux grandes familles de capteurs, CCD et CMOS (Charge-Coupled Device et Complementary Metal-Oxide-Semiconductor). Electroniquement, ces deux types de capteurs diffèrent essentiellement par leur procédé de fabrication et de lecture de l'information. Les capteurs CCD permettent d'obtenir une plus large surface sensible et donc une meilleure sensibilité tandis que les capteurs CMOS proposent une plus grande rapidité de lecture ainsi qu'une plus faible consommation électrique. Dans les deux cas, chaque photosite (pixel) du capteur est un élément photosensible, généralement une photodiode, répondant de manière non linéaire à la quantité de lumière incidente. Ces éléments photosensibles réagissent à une large gamme de longueur d'onde, depuis l'infrarouge jusqu'aux ultraviolets. Beaucoup de caméras étant prévues pour un usage dans les limites du spectre visible sont pourvues d'un filtre passe bande permettant d'éviter une réponse pour des radiations non visibles. De la même manière,

la conception de capteur couleur repose la plupart du temps sur la disposition d'un ensemble de micro filtres ayant pour but de spécialiser chaque photosite dans la captation d'une certaine bande de longueur d'onde (RGB pour Rouge, Verte et Bleue). Il existe néanmoins des systèmes alternatifs tel que le Foveon® qui permet de distinguer les longueurs d'onde par leur pénétration dans le silicium, ou les systèmes multi capteurs placés derrière un système de prisme et/ou de miroirs permettant la séparation des différentes bandes.

Un des problèmes liés au capteur est que, par nature, il discrétise l'espace en fonction de sa résolution spatiale. Autrement dit, l'image continue est échantillonnée spatialement avec une fréquence déterminée directement par la taille des pixels du capteur. Il est donc possible de voir apparaître un phénomène de repliement de spectre (aliasing) dans le cas d'une image capturée dont les détails sont suffisamment fins (cf. théorème de Shannon [31]). Les capteurs modernes étant d'une résolution particulièrement fine, ce problème est néanmoins de plus en plus marginal.

Lors d'une acquisition nécessitant un temps d'exposition long, dépassant quelques secondes, le capteur peut s'échauffer. Cette hausse de température est une énergie qui est à même d'être capturée et peut ainsi générer un signal parasite appelé bruit thermique [32]. Ce problème est par exemple particulièrement présent lors de l'acquisition d'images astronomiques.

i. L'électronique

Chaque photosite du capteur délivre un signal électrique brut plus ou moins intense en fonction de la quantité de lumière captée et de sa longueur d'onde. En fonction de variations dues aux procédés de fabrication, les réponses des photosites ne sont pas forcément linéaires ni constantes de l'un à l'autre. Le premier rôle de l'électronique de traitement est de normaliser la réponse globale du capteur en appliquant une amplification adaptée aux signaux [33].

L'électronique de traitement est également en charge de l'amplification du signal global : on parle de gain. Cette notion est très importante puisque l'augmentation non maîtrisée de la valeur du gain peut générer un bruit électronique important pouvant, dans les cas extrêmes, dénaturer le signal au point de le rendre illisible.

L'électronique de traitement est également utile dans le cas de capteurs couleurs puisque ces derniers reposent le plus souvent sur l'utilisation de micro-filtres permettant de spécialiser chaque photosite pour une bande spectrale. Les filtres les plus couramment utilisés (Bayer) spécialisent les pixels par groupes de quatre, à raison de deux pixels « vert », un « bleu » et un

« rouge ». L'information « couleur » est donc répartie spatialement et le rôle de l'électronique de traitement va être de réaliser une interpolation afin de délivrer une information « RGB » pour chaque pixel.

Le signal délivré par le capteur est analogique et l'électronique de traitement a également pour rôle de le numériser. La qualité de la numérisation est déterminée par la finesse de l'encodage qui peut être réalisé en utilisant 8 bits (256 valeurs) par pixel, pour une image en niveau de gris ou encore 24 bits pour une image couleur RGB (chaque bande de couleur étant encodée sur 8 bits). Certains systèmes plus performants permettent l'encodage de chaque bande de couleur du signal sur 12 ou 16 bits (4096 ou 65536 valeurs).

L'électronique accolée au capteur est donc en charge de nombreuses opérations. La bonne maîtrise de celles-ci permet de limiter au maximum les erreurs induites par cette étape (bruit électronique).

d. Etat de l'art sur la microscopie optique

Pour atteindre nos objectifs, nous avons besoin d'acquérir des images microscopiques. Nous avons détaillé la chaîne générique d'acquisition d'images dans la partie précédente. Nous allons maintenant présenter un bref état de l'art sur les techniques de microscopie optique. Nous n'entrerons pas ici dans le détail du fonctionnement de chaque technique.

Nous n'aborderons pas les méthodes de microscopie électroniques (transmission, balayage...), à sondes locales (force atomique, effet tunnel...) ou ioniques dont nous n'avons pas fait usage. Nous allons également nous concentrer sur les méthodes de microscopie optique en transmission (la lumière passe à travers la cible) plutôt que sur les méthodes de microscopie optique en réflexion qui trouvent leur plus grande utilité dans l'observation des minéraux ou des métaux.

La figure 18 montre le schéma d'un microscope optique en transmission classique avec ses éléments principaux, la source lumineuse, la cible et le système optique composé du couple objectif/oculaire. Dans les applications d'imagerie numérique, l'oculaire est remplacé par une caméra (capteur).

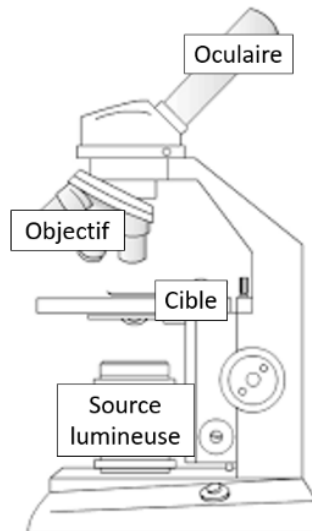


figure 18: schéma d'un microscope optique classique

- Microscopie en champ clair : il s'agit de la méthode de microscopie optique de base. La source lumineuse utilise les longueurs d'onde du spectre visible (lumière blanche) [34]. Cette technique ne permet pas d'obtenir un très bon contraste ni une forte résolution.
- Microscopie en champ sombre : Cette technique consiste à modifier l'alignement de la source lumineuse afin de ne collecter que la lumière diffusée par l'échantillon [35]. Cette technique permet d'augmenter le contraste de l'image mais pas sa résolution. Elle est également plus complexe à utiliser du fait de la faible quantité de lumière collectée.
- Microscope à contraste de phase : Cette technique, développée par F. Zernike (prix Nobel 1953 pour cette innovation) permet de créer du contraste à partir des différents indices de réfraction de la cible [36]. Elle permet donc d'obtenir des images avec un très bon contraste mais son utilisation interdit l'usage d'une cible trop épaisse.
- Microscope à contraste interférentiel : c'est une évolution du microscope à contraste de phase qui permet d'en diminuer les effets indésirables (effet de halo pour les petits objets) [36].
- Microscopie confocale : Cette technique permet d'observer un plan précis de la cible et surtout, de s'affranchir des perturbations liées à la lumière en dehors du plan focal [37]. Elle permet d'observer la cible par coupes transversales fines successives.
- Microscopie en fluorescence : Cette technique, souvent utilisée en conjonction avec la microscopie confocale [37], repose sur le principe de la fluorescence qui permet de marquer précisément certains éléments afin d'obtenir des observations précises de ceux-ci. Dans le quatrième chapitre, nous reviendrons plus en détail sur la microscopie en fluorescence et en particulier sur la technique biphotonique [38].

e. Types d'images

Les différentes technologies de microscopie donnent accès à autant de type d'observations qu'il s'agit de capturer. Le type d'image obtenu est ainsi variable en fonction du capteur associé au microscope et devra être adapté à chaque problématique scientifique. Le type des images acquises varie selon un paramètre spatial mais également selon un paramètre vectoriel :

- Dans le domaine spatial, la donnée essentielle est la résolution de l'image qui est donnée par le nombre de lignes et de colonnes que celle-ci comporte. L'obtention d'une image numérique implique de discrétiser l'espace, chaque pixel représente donc une petite zone, non ponctuelle au sens mathématique du terme. Il est donc très important d'avoir une résolution suffisamment fine, à même de capturer l'intégralité des détails de la scène observée, on peut faire ici référence au théorème d'échantillonnage de Shannon [31]. Ce type d'image est, par exemple, très approprié dans le cas d'acquisition mettant en œuvre une sonde fluorescente unique dont on observera très finement la répartition.
- Dans le domaine vectoriel (spectral) de l'image, il s'agit de la quantité d'information portée par chaque pixel. Il est, là aussi, très important d'adapter le type d'image à l'observation. Un format en nuances de gris, utilisant un capteur dépourvu de filtre et donc à même de capturer plus précisément l'information (pas d'interpolation nécessaire), sera très adapté pour l'observation de structures très fines, par exemple, les gravures de microprocesseurs. Les formats couleur et multispectral permettront eux, d'explorer les propriétés physiques de la scène observée à travers une étude appropriée des spectres de transmittance, réflectance et absorption. Ce type d'image est, par exemple, appropriée pour une étude mettant en jeu plusieurs sondes fluorescentes, marquant des éléments distincts en émettant chacune leur propre longueur d'onde.

Il faut également prêter une attention particulière au choix de la profondeur d'encodage de l'image. Une problématique concernant des détails spectraux très fins, tels que, par exemple, la distinction de tissus malades de tissus sains, tirera un fort bénéfice d'un encodage très étendu (12 ou 16bits par bandes) alors qu'un encodage sur 8 bits se révélera souvent suffisant pour révéler les détails structurels d'une image, il est d'ailleurs intéressant de noter que dans le domaine de l'affichage des couleurs, la notion de « couleurs vraies » est associée à un encodage sur 8 bits des bandes rouge, verte et bleue.

f. Les problèmes liés à l'imagerie numérique

L'imagerie numérique est devenue un outil indispensable car elle permet de sauvegarder les observations, sans dégradation et sans limite de temps. Celles-ci seront donc toujours disponibles pour être analysées et ré-analysées par les spécialistes afin de pouvoir en extraire les informations les plus pertinentes en fonction de l'état de l'art contemporain des connaissances du domaine.

Néanmoins, il est très réducteur de limiter l'intérêt de l'imagerie numérique à sa capacité de sauvegarde. En effet, le début du XXI^e siècle, avec les progrès informatiques effectués, a vu la démocratisation de très grandes puissances de calcul et de capacité mémoire qui étaient réservées aux laboratoires de pointe dans les années 90. Cette démocratisation des outils permet d'envisager de manière courante l'utilisation de nombreux traitements d'image plus ou moins complexes (détection automatique des visages, par exemple).

Cette évolution technologique permet aujourd'hui d'acquérir et de stocker un très grand nombre d'images pour une expérience donnée et pose alors la question de leur interprétation car, si l'outil informatique est sans cesse plus performant, le traitement manuel de grandes quantités d'images par les experts à même de les analyser n'est plus envisageable.

Nous voyons apparaître là un des intérêts majeurs de l'imagerie numérique qui nous pousse, de manière évidente, à faire appel cette puissance de calcul sans cesse grandissante pour effectuer l'analyse et l'interprétation de collection d'images. Le traitement automatisé des images fait apparaître une grande problématique du domaine : nous avons vu qu'une image est une matrice de valeurs, mais **comment passer de cette matrice à une information sémantique et/ou à des variables pertinentes ?** Le travail du traiteur d'image consiste alors à utiliser, développer et inventer les outils nécessaires pour extraire les informations les plus pertinentes afin de décrire, de manière sémantique, ce que contient l'image analysée.

Ceci étant, il existe une quasi-constante dans tous les problèmes de traitement d'image : avant même de chercher à reconnaître le type d'un objet dans une image, une étape quasi incontournable consistera simplement à séparer l'image en un ensemble de zones, chacune pouvant correspondre à un objet particulier ou à une partie d'objet, on parle alors de **segmentation** de l'image [39], [40]. Fort de cette première étape de segmentation, il s'agira alors d'attribuer un label sémantique à chaque région ainsi déterminée, on parlera alors de **classification**.

Ces problématiques de reconnaissances d'objets dans les images sont primordiales mais reposent sur une idée simple qui est que l'image en elle-même représente exactement ce qu'elle est censée représenter, autrement dit, que l'image numérique est « parfaite ». On pourrait naïvement penser que l'acquisition d'une image d'un fond uniforme donne une image uniforme ou même l'acquisition d'une image dans l'obscurité parfaite donne un résultat parfaitement et uniformément « noir ». Dans les faits, il existe, à chaque niveau de la chaîne d'acquisition, des imprécisions inévitables qui vont ajouter différents types de bruits ou de perturbations :

- Il est techniquement impossible de garantir l'uniformité d'une source lumineuse [29]. Il existe des techniques pour s'approcher au maximum de cette uniformité qui permettent dans la plupart des cas de s'affranchir de ce problème, néanmoins, dans certains cas, et en particulier dans le cas de nos images, c'est un facteur qu'il faut prendre en compte.
- La scène observée peut présenter des défauts, en particulier lorsqu'il s'agit d'une scène naturelle. Dans le cas d'images microscopiques biologiques, il pourra par exemple s'agir de problème de sédimentation donnant des cellules hors champ et donc floues. Il peut également s'agir d'une configuration particulière des objets composant la scène et occasionnant le masquage partiel de certains objets à identifier.
- Le système optique, de par son procédé de fabrication (qualité des lentilles), pose des problèmes d'aberration qui ne peuvent généralement pas être totalement éliminés. Les réglages employés influent également sur la netteté de l'image formée dans le plan focal. La précision de l'observation est alors déterminée par la taille de la tâche formée par chaque point de la scène sur le plan d'observation [41].
- Le capteur présente des caractéristiques physiques propres et il est quasi impossible de garantir une réponse strictement identique de chaque pixel. Il appartient alors à l'électronique de traitement de corriger cette non uniformité. Le capteur réagira également à toute radiation pouvant l'atteindre [42].
- Le système de traitement est bien souvent à l'origine d'une grande partie du bruit constaté dans l'image numérique, d'une part, à cause de la notion de gain, indispensable pour obtenir une image mais difficile à maîtriser pour ne pas la dénaturer, et d'autre part, du fait de la nécessaire numérisation du signal jusqu'alors analogique. Cette numérisation, aussi précise soit elle, engendre forcément une approximation et donc une perte.

Le traitement de ces différents types de bruits et les corrections d'uniformité de l'image sont donc des enjeux très importants pour le traiteur d'image car ils conditionnent intrinsèquement la qualité de tout résultat [43] concernant l'analyse de la scène elle-même.

g. Stratégie de traitement d'image

Dans le contexte qui nous intéresse, l'imagerie microscopique correspond à la discipline qui regroupe les techniques utilisées dans le but d'**observer**, d'**analyser**, d'**interpréter** les images et mesures obtenues à l'aide de capteurs implantés sur diverses plates-formes de microscopie optique. Le processus du système imageur comporte quatre phases :

- Une source d'énergie ou d'illumination
A l'origine de tout processus d'imagerie microscopique se trouve nécessairement une source d'énergie pour illuminer la cible. Dans le cas de microscopie optique qui nous intéresse, il s'agit notamment des ondes électromagnétiques provenant de l'éclairage.
- Une interaction avec la cible
Dans la plupart des cas, la cible, placée sur un support adapté, est traversée par la source d'énergie incidente. Une partie de l'énergie va alors être absorbée ou réfléchié tandis qu'une autre partie sera transmise et observable. Les caractéristiques physiques de la cible puis les interactions avec le rayonnement incident déterminent le rayonnement qui sera observable
- Enregistrement de l'énergie par le capteur
Une fois l'énergie diffusée ou émise par la cible, elle doit être capturée pour être enfin enregistrée. L'énergie enregistrée par le capteur est transmise, souvent par des moyens électroniques, à une station de réception où l'information est transformée en images (numériques ou photographiques).
- Interprétation et analyse
Une interprétation visuelle et/ou numérique de l'image traitée est ensuite nécessaire pour extraire l'information que l'on désire obtenir sur la cible.

Pour chacune de ces phases (figure 19), et en particulier lors de l'interprétation et l'analyse de l'image, il est nécessaire d'avoir d'éventuelles données et/ou connaissances extérieures que l'utilisateur peut intégrer dans la stratégie d'analyse.

La stratégie de traitement d'image consiste à utiliser ces connaissances extérieures afin d'affiner les processus de traitement d'image dans le but de mieux comprendre la cible et de nous en faire découvrir de nouveaux aspects et aider à résoudre un problème particulier.

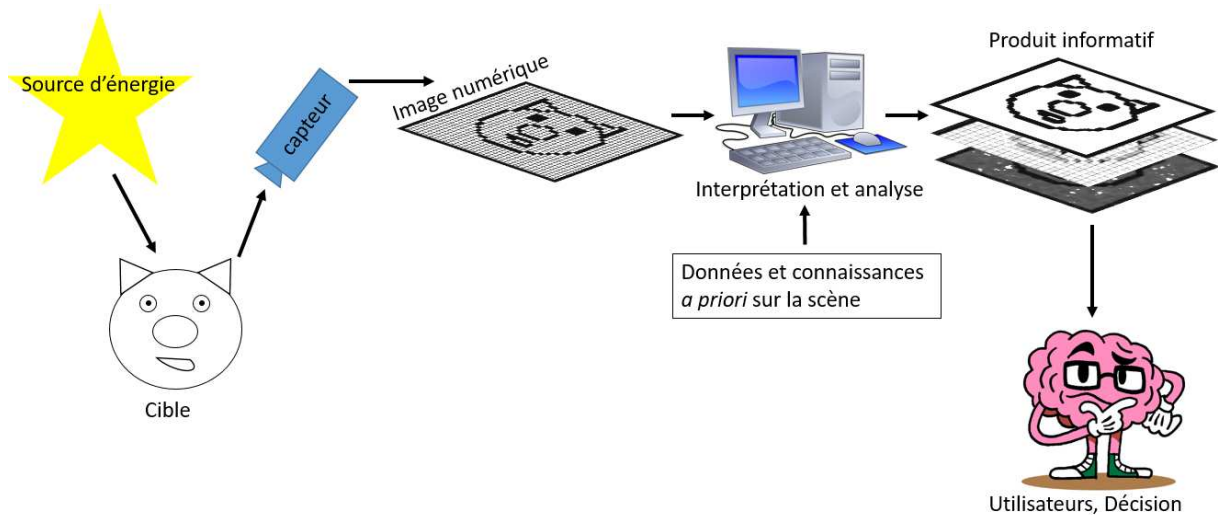


figure 19: schéma général, de l'acquisition à l'interprétation des images

De facto, la problématique scientifique dicte non seulement les choix de stratégies de traitement d'image mais également d'acquisition de ces images. Les connaissances extérieures à apporter seront les meilleurs moyens d'observer un phénomène particulier et la forme des observations attendues. Ces observations, avec les *a priori* nécessaires à leur interprétation, nous renseignent sur la signification attendue des valeurs attribuées aux pixels et constitueront le matériau de base pour la construction d'une stratégie de traitement et d'extraction d'informations adaptée à la problématique.

Ces connaissances *a priori* peuvent être de différentes natures :

- **Structurelle** : Les acquisitions sont faites en nuances de gris, le travail du traiteur d'image sera, ici, d'étudier les relations de positionnement entre les pixels afin d'extraire une information pertinente.
- **Spectrale** : Les acquisitions ajoutent une dimension « couleur » qui permet au traiteur d'image d'accéder en partie aux propriétés physiques de transmittance, réflectance et absorption de la scène.
- **Nature de la cible** : Cela paraît évident mais une stratégie de traitement d'image suppose d'avoir une connaissance à priori fort sur la nature de la cible observée et donc sur la sémantique de l'image. Par exemple, même un opérateur peu qualifié peut faire immédiatement la différence entre une image microscopique en nuances de gris, la

photographie d'une scène quotidienne et une image de télédétection en fausses couleurs et déterminer assez rapidement les éléments d'intérêt contenus dans ces images. En revanche, cette contextualisation de la cible est, dans le cadre du traitement d'image, une étape reposant uniquement sur la connaissance *a priori* de la nature des images à traiter.

3. Du cas d'étude biologique aux problématiques de traitement d'image

L'équipe PMB du laboratoire PAM s'attache à décrire les mécanismes impliqués dans la survie et la mort de micro-organismes soumis à des stress de différentes natures tels que :

- **Les stress physiques** : traitements thermiques (hypo ou hyperthermiques), hautes pressions hydrostatiques, champs électriques pulsés.
- **Les stress physico-chimiques** : variation de la pression osmotique (voir annexe 5) ou du potentiel d'oxydoréduction.

L'équipe PMB étudie le rôle des mécanismes actifs et passifs impliqués dans la survie et la mortalité lors de l'application de tels traitements [44]. Les mécanismes passifs mettent en jeu les propriétés physico-chimiques des constituants cellulaires indépendamment de l'activation des voies de régulations physiologiques aussi appelées mécanismes actifs [45]. Les principaux mécanismes passifs étudiés au laboratoire PAM rendent compte des changements de structure de la membrane plasmique tels que les variations du volume cellulaire et de la perméabilité membranaire [46]. Le laboratoire cherche à estimer la part relative des mécanismes actifs impliqués dans la survie et la mort de cellules soumises à des perturbations de différentes natures. La compréhension des mécanismes actifs et passifs mis en jeu permettra à terme d'optimiser les procédés de conservation et de destruction des microorganismes [47].

Les travaux de cette thèse s'organisent autour de deux études biologiques bien distinctes. Une première étude s'attache à caractériser les taux de survie des levures *saccharomyces cerevisiae* en présence de stress osmotique et une seconde étude s'attache à expliquer les raisons de la survie ou non des levures en présence de stress thermiques.

Ces deux études biologiques ont donné lieu à l'acquisition de collections d'images microscopiques (confocale et biphotonique) dont les biologistes extraient actuellement les

informations pertinentes manuellement. Nos problématiques vont s'orienter sur l'automatisation, la robustesse et la répétabilité de l'extraction de ces informations via l'utilisation d'outils de traitement d'image.

a. Survie des levures en présence d'un stress osmotique

Nos travaux contribuent aux études menées au sein du laboratoire PAM dans le cadre de la compréhension des mécanismes impliqués dans la survie et la mort de levures *saccharomyces cerevisiae* exposées à un stress osmotique.

i. Protocole expérimental et objectif de l'expérience

Les travaux du Dr Stéphane Guyot (UMR PAM, équipe PMB) ont pour but de comprendre l'influence des stress osmotiques sur la survie des cellules. Des cultures de cellules *saccharomyces cerevisiae* sont plongées dans des milieux de culture spécifiques leur imposant différents stress osmotiques composé d'un régime transitoire (augmentation progressive de la pression osmotique au cours du temps) puis d'un régime stationnaire (maintien de la pression osmotique au cours du temps).

L'objectif biologique de cette expérience est de mesurer le taux de survie des cellules soumises à ces stress. Pour effectuer cette mesure, 137 images de ces cultures ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal. Les cultures ont été disposées sur des lames de comptages de Malassez (figure 1, page 11) afin de pouvoir accéder à une mesure de la concentration cellulaire.

Le comptage des cellules est habituellement opéré manuellement par un expert en suivant un protocole strict (voir page 108). Comme nous l'avons déjà souligné page 8, ces comptages manuels sont emprunts de subjectivité et d'autres inconvénients que nous allons pallier par l'apport de techniques de traitement d'image.

ii. Problématiques du traitement d'image et stratégie associée

Les coûts et/ou la complexité d'usage des systèmes de comptages automatiques commerciaux, combiné aux nombreux avantages que présente l'analyse d'image, nous ont orientés vers le développement de nouvelles méthodes afin de procéder de manière automatisée au comptage des cellules. Les lames de comptage Malassez utilisées pour notre expérience présentent un quadrillage permettant de déduire la concentration cellulaire dans le milieu. Cette grille est indispensable car elle définit la zone d'intérêt où les cellules seront dénombrées.

Cependant la grille devient un artefact lorsqu'il faut identifier les cellules, particulièrement si les cellules la chevauchent. Il sera donc indispensable de l'effacer dans le but d'optimiser l'identification des cellules.

D'un point de vue du traitement d'image, les problèmes à résoudre sont donc :

Comment extraire les informations apportées par la grille dans l'image ?

Comment effacer la grille en vue d'optimiser le comptage cellulaire ?

Comment compter précisément les cellules ?

Le protocole expérimental comporte l'adjonction de glycérol à différentes concentrations, dont les propriétés optiques rendent impossible la réalisation d'une acquisition standardisée. On obtient donc une forte variabilité dans les acquisitions (voir page 60). Cette variabilité va également être un des problèmes à prendre en compte lors du traitement de nos images.

Pour répondre à ces problématiques, nous proposons une stratégie avec trois objectifs :

- Extraire l'information utile de la grille : caractériser la grille et déterminer la zone d'intérêt pour le comptage.
- Effacer la grille de l'image sans altérer les cellules présente de manière à faciliter l'étape suivante qu'est le comptage.
- Développer des approches de traitement de la grille et de comptage cellulaire robustes, à même de fonctionner malgré la standardisation impossible des acquisitions.

La figure 20 présente de manière synthétique la stratégie de traitement que nous proposons afin d'identifier, caractériser et enfin, effacer la grille.

Une fois la grille retirée de l'image et la zone d'intérêt identifiée, La phase de comptage repose avant tout sur l'identification individuelle des cellules. L'image préparée ne contient alors plus que deux types de zones correspondant respectivement au fond et aux cellules. L'objectif est donc de détecter chaque cellule individuellement de manière robuste et précise.

Notons que la qualité du résultat ne peut être jugée uniquement sur le comptage effectif et qu'il convient de regarder attentivement les proportions de faux positifs ainsi que de faux négatifs. Ces deux types d'erreurs peuvent facilement se compenser mutuellement et donner l'impression faussée d'un résultat correct.

Le comptage ne comporte finalement qu'une étape, la segmentation des cellules. Il est apparu que les outils classiques de la littérature n'apportaient pas des résultats à la hauteur de nos espérances. En effet, leur utilisation nécessite des réglages très précis engendrant un nombre non négligeable de faux positifs (voir page 127). Nous avons donc axé nos travaux sur l'amélioration de ces outils afin de gagner en précision.

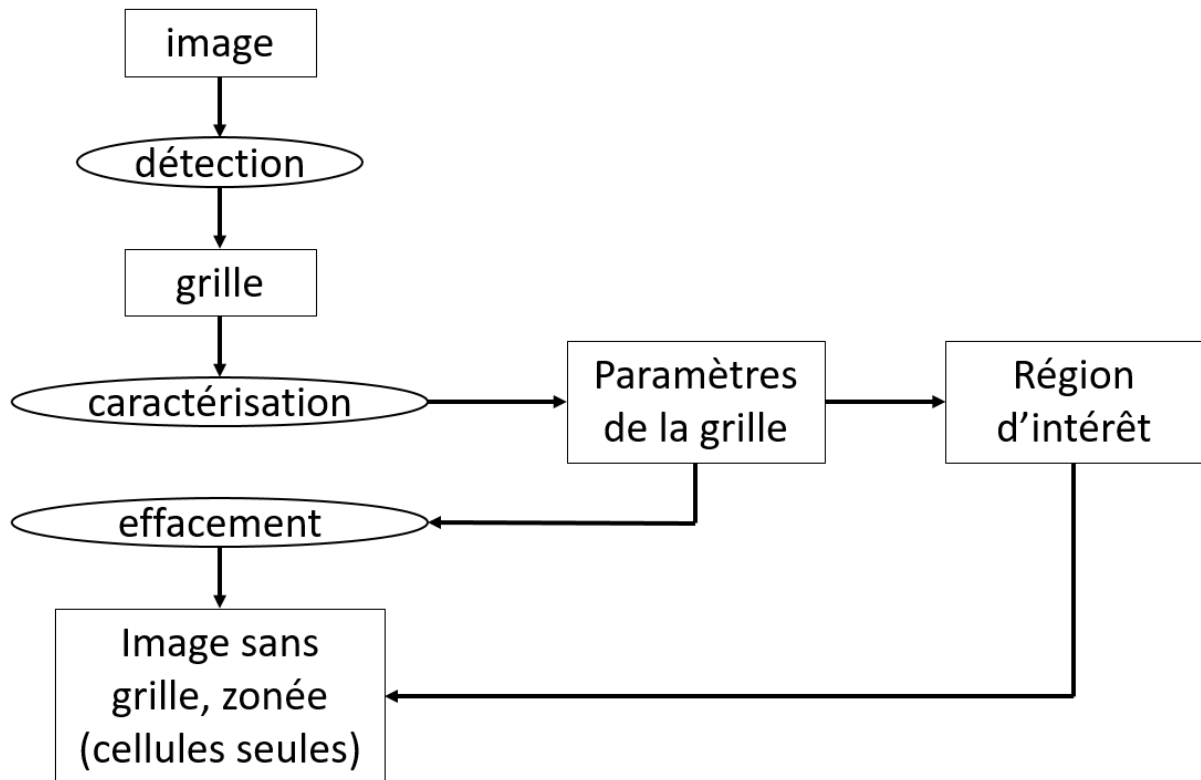


figure 20: stratégie de traitement de la grille de Malassez

b. Survie des levures en présence de stress thermiques : Etude de l'apparition d'agrégats ribo nucléoprotéiques

Dans cette seconde étude, nous nous intéressons aux cellules vivantes ; la notion de « vie » pour une cellule peut être vue comme sa capacité à accomplir certaines actions liées à son métabolisme. Nous allons nous intéresser ici à une de ces actions en particulier : la synthèse protéique. Plusieurs éléments, dont les ribosomes ou les acides ribonucléiques messagers (ARNm), entrent en jeu dans le mécanisme de synthèse protéique. En présence d'un stress thermique (hausse de température du milieu de culture), On observe une agrégation de ces éléments avec des protéines présentes dans le cytoplasme formant des structures appelées agrégats ribo-nucléoprotéiques, que nous abrègerons en « RNPs » dans ce manuscrit (figure 2, page 12).

La formation des RNPs est un processus réversible [48] ; les conditions spécifiques conduisant à leur apparition étant dissipées et l'environnement revenu à la normale, on peut observer une désagrégation des RNPs.

i. Protocole expérimental et objectif de l'expérience

L'hypothèse biologique amenée par le Dr Stéphane Guyot (UMR PAM, équipe PMB) est que l'apparition des agrégats dans les cellules pourrait être corrélée avec leur taux de survie lors d'un traitement thermique. Les RNPs pourraient, en quelque sorte, jouer un rôle de protection des mécanismes de la vie. L'étude et la compréhension du fonctionnement de ce mécanisme d'agrégation, de son intensité (taille et nombre de RNPs dans la cellule), des facteurs qui le déclenchent sont essentiels pour les microbiologistes.

Dans la littérature, l'observation de ce mécanisme d'agrégation est en général effectuée manuellement sur quelques cellules isolées. L'objectif ici est d'**observer en masse l'apparition des RNPs** sur un très grand nombre de cellules pour déterminer s'il existe une corrélation entre l'apparition des RNPs et le taux de survie des cellules.

Pour cette étude, des cultures de *saccharomyces cerevisiae* BY4742 Pab1-GFP ont été utilisées, il s'agit d'une souche présentant une mutation leur permettant de produire une protéine Pab1p-GFP (fusionnée avec un marqueur fluorescent, GFP pour Green Fluorescent Protein). Ces cultures ont été soumises à différents types de stress thermiques et ont ensuite été observées grâce à un microscope utilisant la technologie biphotonique. Une collection de 210 images a ainsi été acquise.

Une des idées clé de ce travail a été d'obtenir une vision statistique et impartiale du développement des RNPs en évaluant leur développement dans l'ensemble de la culture.

Chaque image acquise contient environ 40 cellules, en partant des 210 images acquises pour cette étude, nous arrivons environ 8000 cellules à analyser. C'est une limite importante dans l'interprétation manuelle de ces images (à raison de 10s par cellule interprétée, cela signifie environ 22 heures de travail). L'expert devra alors échantillonner quelques cellules. Cet échantillonnage ainsi que l'*a priori* de l'expert peuvent entraîner un biais statistique dans l'évaluation du nombre de RNPs à même de fausser les conclusions de l'expérience.

Lors de nos travaux, nous avons également pu déterminer que l'identification et la quantification manuelle des RNPs est un travail extrêmement complexe et engendre une très

grande variabilité de résultats entre les différents opérateurs (voir page 159). L'origine de cette variabilité vient de la nature des RNPs eux-mêmes dont la forme et la dynamique de formation rend les contours très vagues. Il s'agit là d'une autre limite de l'interprétation manuelle puisque cette grande variabilité nous indique que cette méthode de comptage n'est pas fiable.

Les outils de traitement d'image sont donc une solution pertinente pour pallier ces limites.

ii. Problématiques liées aux images de fluorescence et stratégies associées

La méthode de microscopie biphotonique a été utilisée pour cette expérience car elle présente de nombreux avantages. En tout premier lieu, les concentrations de fluorochrome, donc de protéine, donnent un signal très intense. Cette intensité majorée permet l'utilisation de méthodes de base, telles que de simples seuillages, pour segmenter l'image [40]. Les images étudiées se révèlent avoir deux natures très différentes qui vont imposer des contraintes spécifiques à l'extraction de l'information pertinente :

- Présence de fluorescence diffuse : Les protéines qui sont présentes dans les cellules sans s'être agrégées créent une fluorescence diffuse qui permet d'identifier très facilement celles-ci (figure 21). L'enjeu, dans ce cas, sera d'estimer le nombre d'agrégats présent dans chacune des cellules identifiées.

Dans ce cas, le problème est donc :

En présence de fluorescence diffuse, comment estimer précisément le nombre d'agrégats présent dans chaque cellule ?

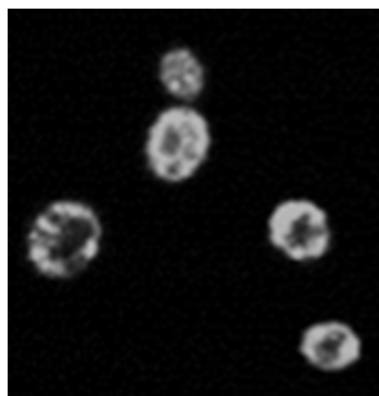


figure 21: extrait d'une image avec suffisamment de fluorescence diffuse

- Absence de fluorescence diffuse : Dans ce second cas, nous n'avons accès qu'à la fluorescence spécifique au RNPs. Notre matériel ne permettant pas d'obtenir les images en transmission qui auraient été fort utiles pour identifier les cellules individuelles

(figure 22), l'enjeu est donc devenu de regrouper les RNPs appartenant le plus probablement aux mêmes cellules.

Dans ce cas : le problème est donc :

En absence de fluorescence diffuse, comment regrouper les agrégats de manière pertinente dans leurs cellules respectives ?

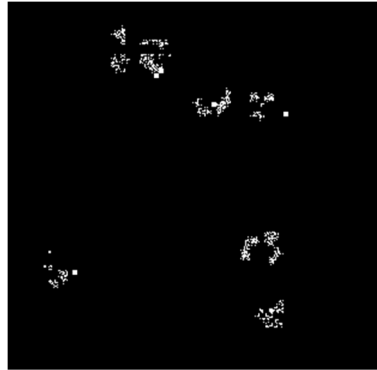


figure 22: extrait d'une image avec peu de fluorescence diffuse

Afin de répondre à ces problèmes, nous allons mettre en place des stratégies de traitement d'image adaptées.

Les problématiques liées aux images, d'une part, et à la variabilité des comptages manuels d'autre part, nous poussent à considérer deux situations :

Lorsque la fluorescence diffuse est suffisamment présente, la segmentation des cellules ne présentant pas de problème particulier, c'est essentiellement la variabilité des comptages manuels qui représente un problème. Une vérité de terrain clairement définie n'étant pas accessible du fait de la très forte variabilité des résultats, la stratégie de traitement aura pour but d'aboutir à la meilleure estimation possible du nombre de RNPs présents (figure 23).

Dans le cas d'absence de fluorescence diffuse, il s'avère que la segmentation des RNPs, et par conséquent, leur comptage, ne pose pas de problème car ce sont les seuls éléments réellement visibles dans l'image. Ils en sont extraits puis individualisés en utilisant des méthodes usuelles (seuillage et ligne de partage des eaux). Il va alors s'agir de procéder à un regroupement pertinent des RNPs pour les attribuer à des cellules(figure 24).

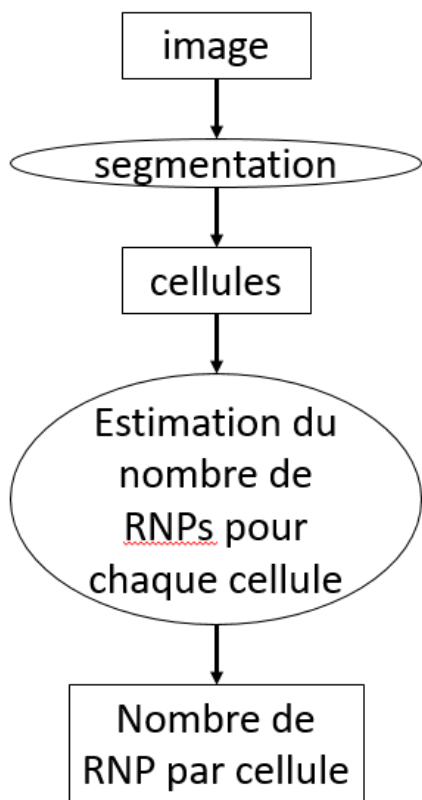


figure 23: stratégie de traitement en présence de fluorescence diffuse

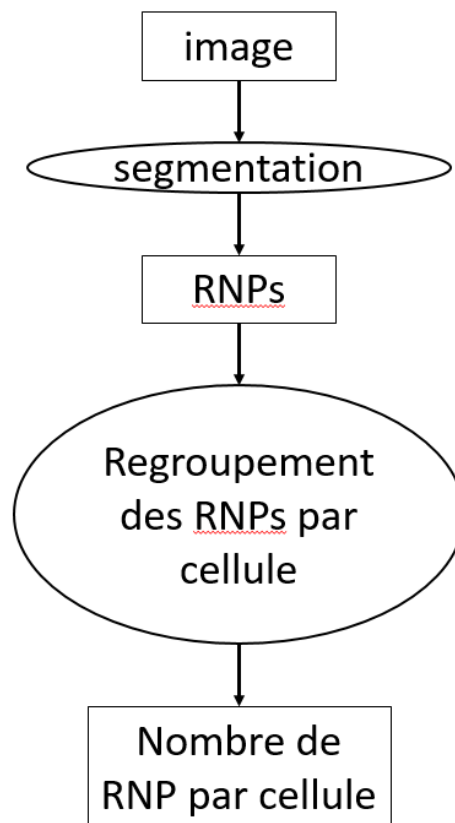


figure 24: stratégie de traitement en absence de fluorescence diffuse

Chapitre 2 : Identification, caractérisation et effacement d'un artefact constitutif des images

1. Introduction

Parmi les expériences menées au sein du laboratoire PAM par le Dr. S. Guyot, un ensemble d'images de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur lame de Malassez a été acquis dans différentes conditions de pression osmotique. Ces images ont été acquises sur le plateau DImaCell¹⁹ (figure 25) en utilisant un microscope droit (Axioplan 2imaging, Zeiss, Marly le Roi, France) équipé d'une caméra noir et blanc (AxioCam MR, Zeiss) pilotée par le logiciel AxioVision Rel 4.8.0.0 (Zeiss). Ce dispositif produit des images au format TIFF de 1296×1026 pixels en 256 niveaux de gris codés sur 8 bits. Un objectif Plan-Apochromat x63/1.4 à immersion dans l'huile (Zeiss) a été utilisé pour observer les cellules disposées sur une lame de comptage.



figure 25: Exemple de microscope utilisé sur la plateforme DImaCell

Il existe plusieurs types de lames microscopique avec un design spécifique à la réalisation de des comptages (Malassez, Thoma, Bürker...), ces lames présentent une cavité d'une profondeur

¹⁹ <http://www.umr-pam.fr/fr/plateaux-techniques/pims.html>

précise, elles sont micro-gravées avec un quadrillage permettant de déterminer un volume donné pour chaque partie de celui-ci (figure 26).

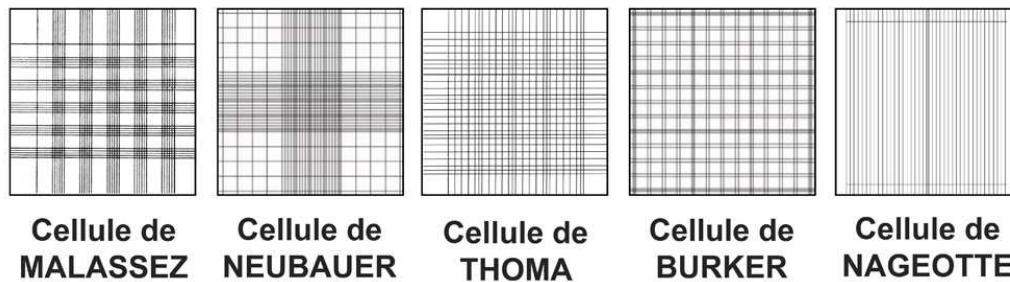


figure 26: illustration des différentes lames de comptage

Pour l'acquisition des images de cette expérience, nous avons utilisé des lames de comptage de Malassez. La grille de comptage de Malassez est micro gravée sur des lames spécifiques. Une occurrence de la grille détermine un volume de solution précis dont on peut facilement déduire une concentration cellulaire à partir du comptage des cellules dans la zone d'intérêt. La grille est également un objet occupant une grande partie de l'image (figure 28) et dans le cas du comptage cellulaire, elle peut être considérée comme un artefact, notamment en cas de chevauchement (figure 27).

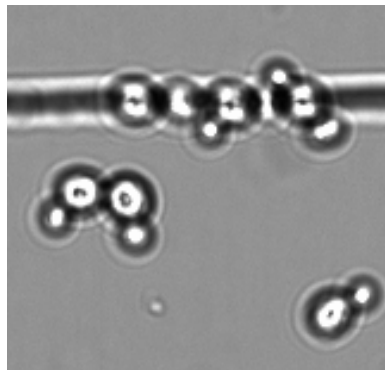


figure 27: exemple de cellules chevauchant un barreau de grille de Malassez

La grille, appartenant à la lame de comptage, est positionnée sous la solution. De fait, elle est parfois partiellement masquée par les cellules en suspension. Enfin, elle est également impactée par toute perturbation dans l'acquisition (flou, bruit ...). La figure 28 montre un exemple d'image microscopique de cellules disposées sur une lame de Malassez.

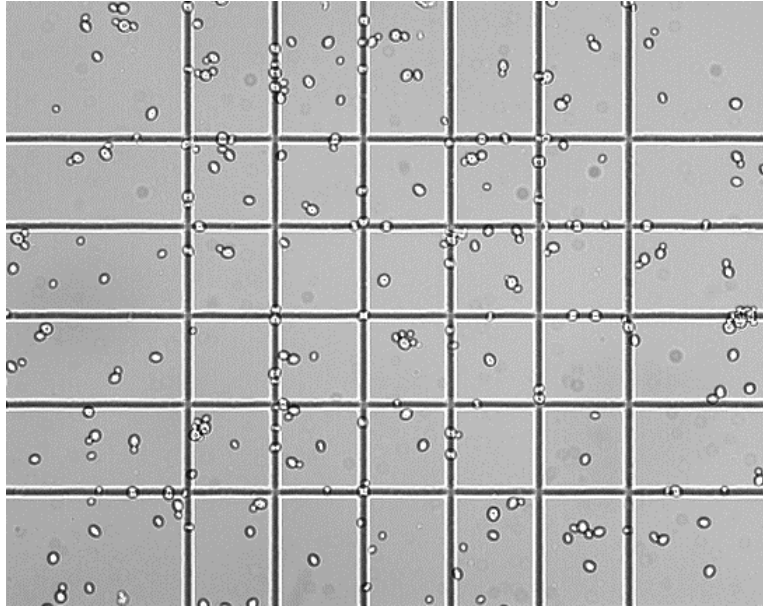


figure 28: Culture de saccharomyces cerevisiae sur lame de comptage de Malassez

a. Objectifs

L'objectif de ce chapitre est de proposer une méthode entièrement **automatisée** pour extraire l'information sémantique de la grille. Pour atteindre cet objectif, deux étapes seront nécessaires :

- **La détection** fiable et robuste de la grille dans l'image.
- **La caractérisation** de la grille pour en extraire une zone d'intérêt mais également réaliser une auto-évaluation de la qualité du résultat.

Le second objectif est de faciliter la détection et le comptage des cellules. Dans ce cas, la grille va être considérée comme un artefact et nous allons chercher à l'**effacer** de l'image.

b. Problématiques « image »

Au total, 137 images ont été acquises manuellement pour cette expérience. Ces images présentent des difficultés liées à la chaîne d'acquisition mais également au protocole expérimental qui comporte l'emploi de glycérol dont les propriétés optiques génèrent un bruit très important dans l'image finale.

Parmi les difficultés, nous pouvons lister (figure 29) :

- **L'échelle** : chaque image a une résolution identique, liée aux caractéristiques de la caméra utilisée. Dans ces images, la taille et la largeur des barreaux de l'objet « grille » varie en fonction des réglages du microscope.
- **Le positionnement** : la grille est toujours présente dans l'image mais, en fonction de l'opérateur, son positionnement change d'une image à l'autre.
- **L'illumination** : il existe deux problématiques liées à l'illumination, la première, son **intensité** est liée aux réglages utilisés par l'opérateur. La seconde, son **homogénéité**, est liée à un léger décalage de la source lumineuse, et génère un gradient d'illumination de l'image (figure 29 A, B).
- **Le contraste** : il est très variable d'une image à l'autre (figure 29 B, C).
- **L'orientation** : l'opérateur ne positionne pas toujours parfaitement la lame de comptage sous l'objectif. La grille n'est donc pas toujours alignée avec les axes de l'image (figure 29 D).
- **Le flou** : la présence de glycérol dans le protocole expérimental rend la mise au point difficile. Même avec un réglage très méticuleux, le contour des objets est parfois diffus (figure 29 E).
- **Le bruit** : il peut être d'origine électronique (mauvais réglage du gain pour la caméra) ou lié à des artefacts ou particules en suspension dans la solution (figure 29 F, G).
- **La densité** : Dans certains cas, la densité très importante de cellules masque la grille de comptage en grande partie (figure 29 H).

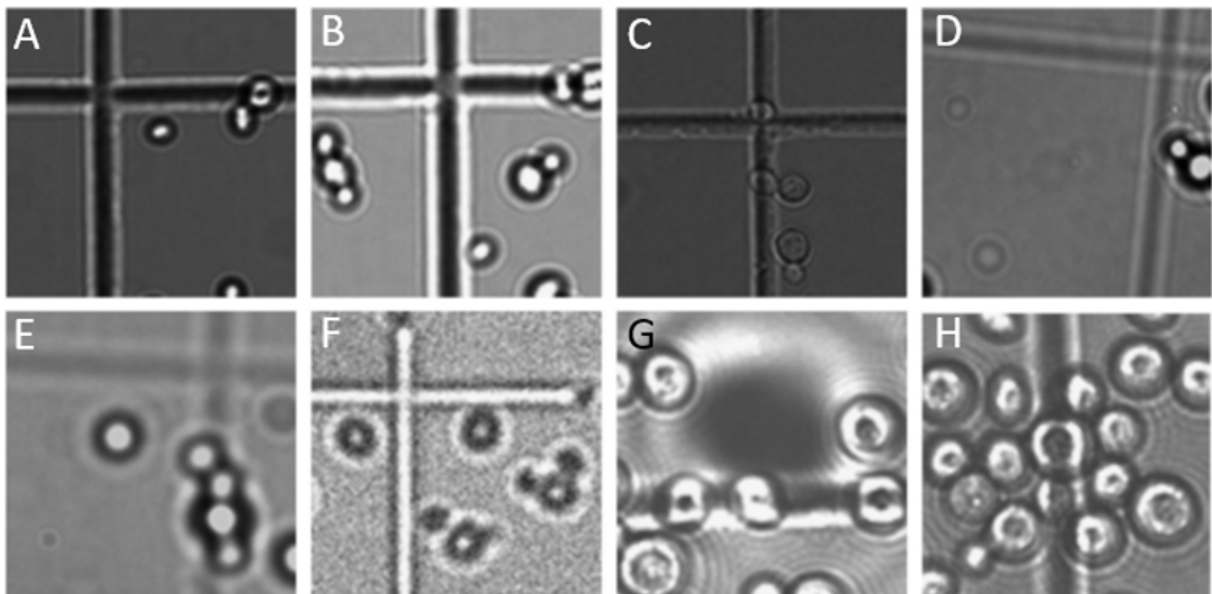


figure 29: exemples de difficultés rencontrées dans les images de culture sur grille de Malassez

c. Plan du chapitre

Nous présentons l'ensemble des travaux relatifs aux traitements concernant la grille de comptage de Malassez dans les images. L'objectif principal est de développer une méthode capable d'extraire l'ensemble des paramètres de la grille pour chaque image, quel que soit le niveau de perturbation présent. Notre but est de limiter au maximum les interventions humaines en proposant une méthode robuste, capable de s'adapter à toutes les perturbations rencontrées.

Dans un premier temps, nous présenterons les deux outils principaux utilisés pour ces travaux :

- La transformée de Fourier discrète
- La transformée de Hough linéaire

Les méthodes morpho-mathématiques ont été également utilisées et sont présentées dans l'annexe 1.

Dans un second temps, nous présentons les prétraitements effectués sur les images ainsi que les optimisations utilisées pour le calcul et l'interprétation de la transformée de Fourier.

Les trois parties suivantes présentent :

- La détection de la grille dans l'image
- La caractérisation de la grille
- L'effacement de la grille

2. Concepts généraux

a. La transformée de Fourier discrète

La transformée de Fourier discrète [49] [50] est un outil classique et puissant de traitement du signal qui permet de décomposer un signal supposé périodique selon l'équation :

$$F(k, l) = \sum_{s=0}^{N-1} \sum_{r=0}^{M-1} f(s, r) e^{-2i\pi(\frac{ks}{N} + \frac{lr}{M})}$$

où f est l'image de dimensions $[N, M]$ dont on calcule la transformée de Fourier F au point (k, l) .

F est une matrice de nombres complexes de même dimension que l'image d'origine. Par commodité, on représente séparément le module et la phase de F .

L'image originale peut être reconstruite à partir des coefficients $F(k, l)$ en utilisant la transformation inverse donnée par l'équation suivante :

$$f(s, r) = \frac{1}{NM} \sum_{k=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{M-1} F(k, l) e^{2i\pi(\frac{ks}{N} + \frac{lr}{M})}$$

Il est donc possible de modifier l'image d'origine en modifiant les valeurs $F(k, l)$ dans l'espace de Fourier.

Une propriété remarquable de la transformée de Fourier est qu'une rotation d'un angle α dans l'espace image se répercute dans l'espace de Fourier selon la relation :

$$\begin{aligned} f(x \cos(\alpha) + y \sin(\alpha), -x \sin(\alpha) + y \cos(\alpha)) \\ \rightarrow F(\omega_1 \cos(\alpha) + \omega_2 \sin(\alpha), -\omega_1 \sin(\alpha) + \omega_2 \cos(\alpha)) \end{aligned}$$

En d'autres termes, la transformée de Fourier 2D contient une information structurelle dans le sens où un phénomène périodique orienté dans l'image engendrera des coefficients orientés selon le même angle dans la transformée de Fourier.

James W. Cooley et John W. Tuckey [50] publient en 1965 un algorithme optimisé, appelé « Fast Fourier Transform » (FFT) qui permet d'accélérer le calcul de la transformée de Fourier discrète. Dans cette thèse, nous utiliserons l'implémentation Matlab® de la FFT.

b. La transformée de Hough linéaire

Paul Hough [51], [52] propose une méthode pour déterminer s'il existe des alignements de pixels dans l'image, et si tel est le cas, déterminer la ou les paramètres des droites mathématiques engendrant ces alignements.

Dans sa version originale, la transformée de Hough associe à chaque pixel (x, y) « allumé » de l'image un ensemble de paramètres $\{a, b\}$ représentant l'ensemble des droites affines $(y=ax+b)$ passant par ce point. Dans cet espace de paramètres, chaque point engendre une droite $(b=y-ax)$. Deux points étant évidemment alignés, les droites ainsi engendrées se croisent en un point (a, b) représentant les paramètres de la droite passant par ces deux points.

Hough introduit la notion d'accumulation : dans une matrice M initialisée à zéro, les droites (a,b) sont tracées en incrémentant d'une unité la matrice en chaque point de chaque droite de sorte que lorsque de nombreux points sont alignés, il apparait des pics de valeurs élevées dans cette matrice au lieu des paramètres déterminant les droites passant par ces points. La limite de cette méthode vient des alignements « verticaux » qui peuvent engendrer des valeurs infinies dans l'espace [a,b] et empêcher la bonne détection de ces alignements. Duda et Hart [53] introduisent l'équation cartésienne en coordonnées polaires pour résoudre ce problème.

$$\rho = y\cos(\theta) + x\sin(\theta)$$

où θ est l'angle de la droite avec l'axe des ordonnées et ρ la distance de la droite à l'origine (figure 30).

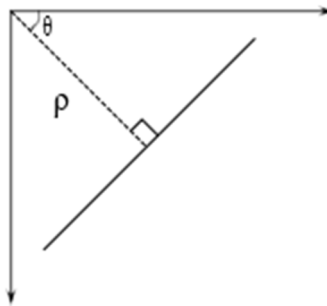


figure 30: illustration du tracé d'une droite en coordonnées polaires

Dans l'espace de paramètre $[\rho, \theta]$, chaque point (x,y) de l'image engendre une sinusoïde.

$$\rho = f(\theta) = y * \cos(\theta) + x * \sin(\theta),$$

où θ prend toutes les valeurs possibles de 0 à π .

Cette paramétrisation permet de résoudre le problème des droites verticales.

Les lieux d'accumulation des intersections entre ces courbes déterminent les paramètres des droites représentant les alignements de pixels dans l'image d'origine.

Dans la pratique, l'espace de paramètres $[\rho, \theta]$ est échantillonné puis représenté par une image. Dans cet espace, également appelé accumulateur, le problème de recherche des alignements de points dans l'image d'origine, à priori insoluble tel quel, est transformé en un problème de recherche de maximums (ou « pics ») pour lequel il est relativement simple de trouver des solutions.

Dans le cas présenté dans la figure 31, les points sont disposés de manière aléatoire. Dans l'accumulateur, il n'est pas possible de distinguer une singularité quelle qu'elle soit. Dans le cas présenté dans la figure 32, les points de l'image d'origine sont très grossièrement alignés. Dans l'accumulateur, un lieu de convergence des intersections commence à se dessiner. Dans le cas présenté dans la figure 33, les points de l'image d'origine sont alignés. Dans l'accumulateur, les sinusôides engendrées ne s'intersectent qu'en un point unique correspondant aux paramètres de la droite portant les points de l'image.

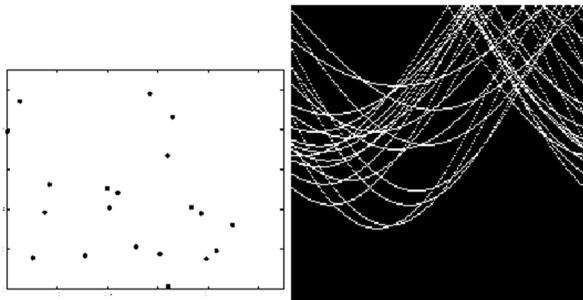


figure 31: ensemble de points aléatoires (gauche) et les sinusôides engendrées dans l'espace de Hough (droite)

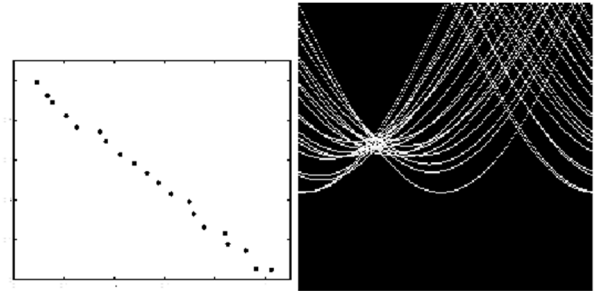


figure 32: ensemble de points quasi alignés (gauche) et les sinusôides engendrées dans l'espace de Hough (droite)

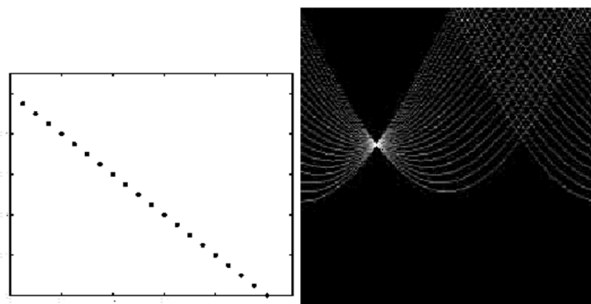


figure 33: ensemble de points alignés (gauche) et les sinusôides engendrées dans l'espace de Hough (droite)

La transformée de Hough linéaire ne fait aucune supposition sur la « continuité » dans l'espace image ; cette notion de continuité dans l'espace discret qu'est l'image pouvant être définie comme une connectivité de chaque point avec ses deux voisins les plus proches appartenant à la même droite. Cette propriété, bien illustrée par la figure 33, permet à la transformée de Hough d'être très robuste dans la détection d'alignements. Elle ne sera pas perturbée par des discontinuités ou de légères perturbations dans le tracé des « lignes ». En effet, des discontinuités ne feront que réduire le nombre de « votes » pour un jeu de paramètres $[\rho, \theta]$ mais tant que le nombre global de points alignés reste important, le pic sera suffisamment important pour être détecté. De même, de légères perturbations dans l'alignement ne

modifient que peu le lieu d'intersection dans l'accumulateur (voir figure 32) et permettront tout de même la détection d'une droite.

Lors du calcul effectif d'une transformée de Hough linéaire, il est important de bien choisir les paramètres, en particulier la taille du voisinage d'exclusion dans la matrice d'accumulation lors de la recherche itérative des maximums. Nous détaillons plus précisément ces paramètres, dans le cadre de l'implémentation Matlab®, dans l'annexe 2.

3. Prétraitements des images

Les images microscopiques acquises pour cette étude sont en niveau de gris. Pour en extraire les informations pertinentes, l'image nécessite quelques prétraitements. Ces prétraitements ont plusieurs utilités :

- Le **traitement du bruit** : le stress osmotique est généré en plongeant les cultures dans le glycérol dont les propriétés optiques induisent un bruit et un flou importants dans les images acquises. Il est donc nécessaire de prétraiter les images dans le but d'éliminer au maximum le bruit présent.
- Le **gradient d'illumination** : lors de l'acquisition d'images sur lame de Malassez, il est difficile d'obtenir une illumination parfaitement homogène (voir figure 36). Nous avons souvent observé un fort gradient dans l'intensité lumineuse de nombreuses images et nous avons donc mis en place un prétraitement spécifique afin d'éviter que ce gradient ne puisse altérer le résultat final.

a. Traitement du bruit

Le traitement du bruit est opéré en utilisant un filtre de Kovesi [54]. Ce filtre réalise une transformation du signal en ondelettes log-Gabor complexes à différentes échelles. Ensuite, le module de la transformée est traité selon la contribution du bruit estimée aux différentes échelles considérées, la phase étant préservée. Souvent, dans le traitement d'image par FFT, seule l'amplitude est exploitée. Cependant, la phase doit être prise en compte, car elle contient des informations cruciales sur la structure géométrique de l'image dans le domaine spatial. C'est le point fort de ce filtre. En effet, la phase porte l'essentiel de l'information géométrique concernant les bords et les contours dans l'image, comme le démontre l'expérience présentée dans la figure 34. L'image C est construite en utilisant l'amplitude de l'image A (l'église grecque) et la phase de l'image B (Aishwarya Rai), tandis que pour l'image D, c'est le contraire.

Malgré l'inversion des modules, nous continuons à reconnaître l'image de départ. De ce fait, nous constatons bien que la plupart des informations sémantiques de l'image sont stockées dans la phase.

Il existe d'autres méthodes de filtrage du bruit à base d'ondelettes ou d'analyse statistique [55] qui se comportent bien en ce qui concerne les contours et les bords. La méthode proposée par Kovési [54] offre l'avantage de déterminer automatiquement le seuil à appliquer pour la correction du bruit. L'excellente qualité des résultats et cet automatisme conviennent donc parfaitement à nos besoins et à nos objectifs d'automatisation maximale.

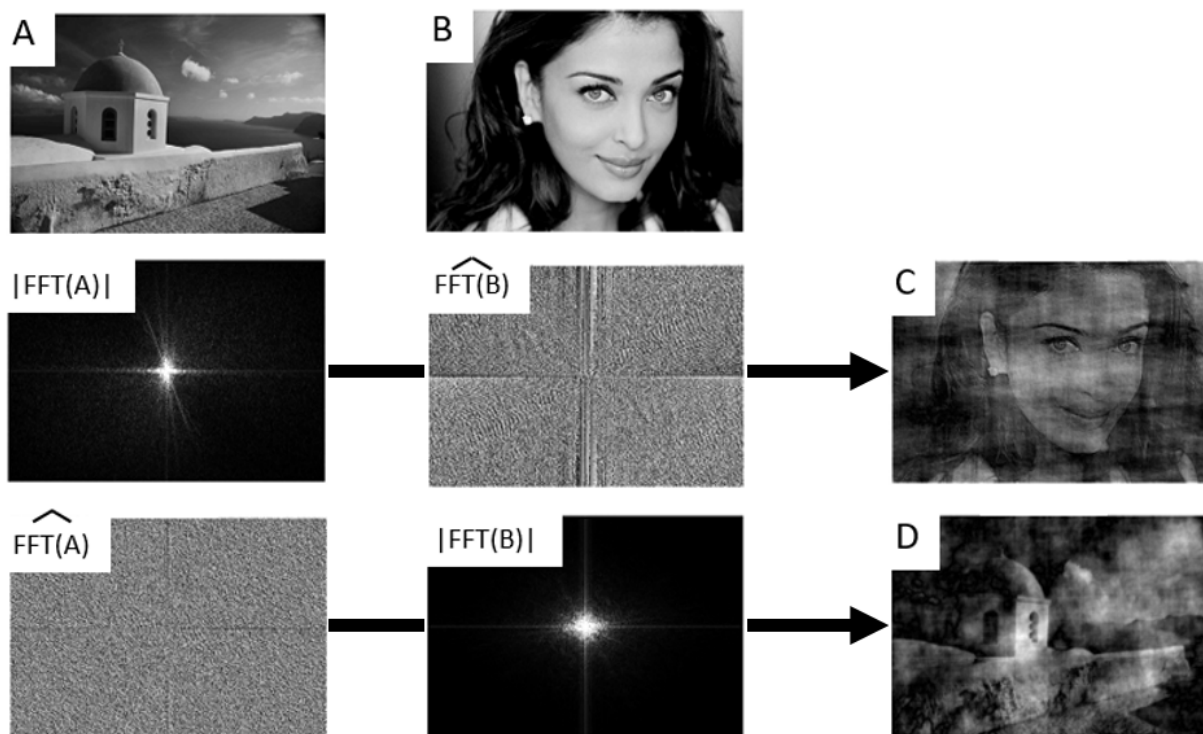


figure 34: exemple d'inversion de phase et de module, chaque image (A,B) a été reconstruite avec sa phase et avec le module de l'autre image, le résultat (C,D) montre clairement qu'on reconnaît l'image possédant la phase d'origine

La figure 35 montre un exemple de l'application du filtre de Kovési à une de nos images.

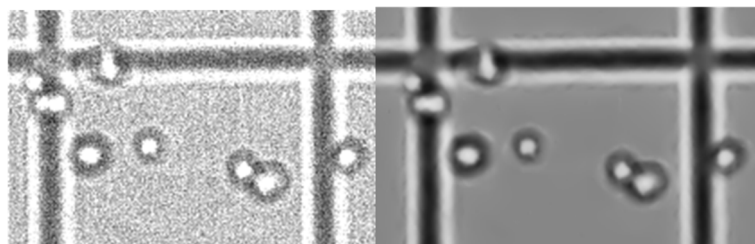


figure 35: Exemple d'application du filtre de Kovési, à gauche, l'image d'origine, à droite, l'image traitée

b. Traitement du gradient d'illumination, filtrage homomorphique

Certaines images de notre échantillon présentent un fort gradient d'illumination. La figure 36 montre l'exemple d'une image et le résultat d'un seuillage à 50% permettant de mettre en évidence la présence de deux zones, claire et sombre.

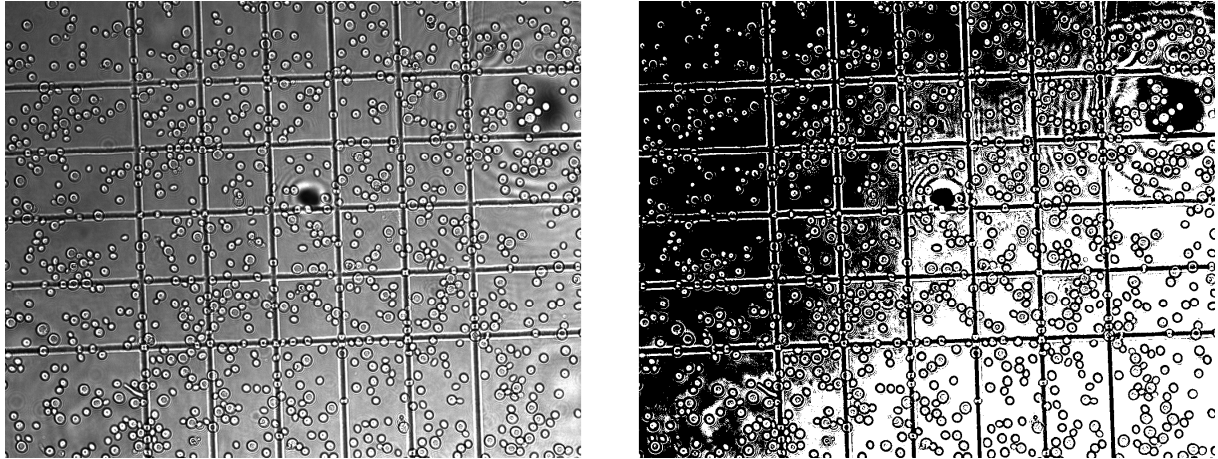


figure 36: Exemple de gradient d'illumination, à gauche, l'image d'origine, à droite, l'image seuillée à 50% pour illustrer clairement le gradient présent

Pour corriger ce gradient [56], [57], il est intéressant de considérer l'image comme une fonction discrète à deux dimensions $f(x, y)$ représentant l'intensité lumineuse perçue en chaque point par l'observateur (ici, la caméra). Le schéma suivant (figure 37) présente un modèle simple, qui omet la prise en compte des optiques utilisées.

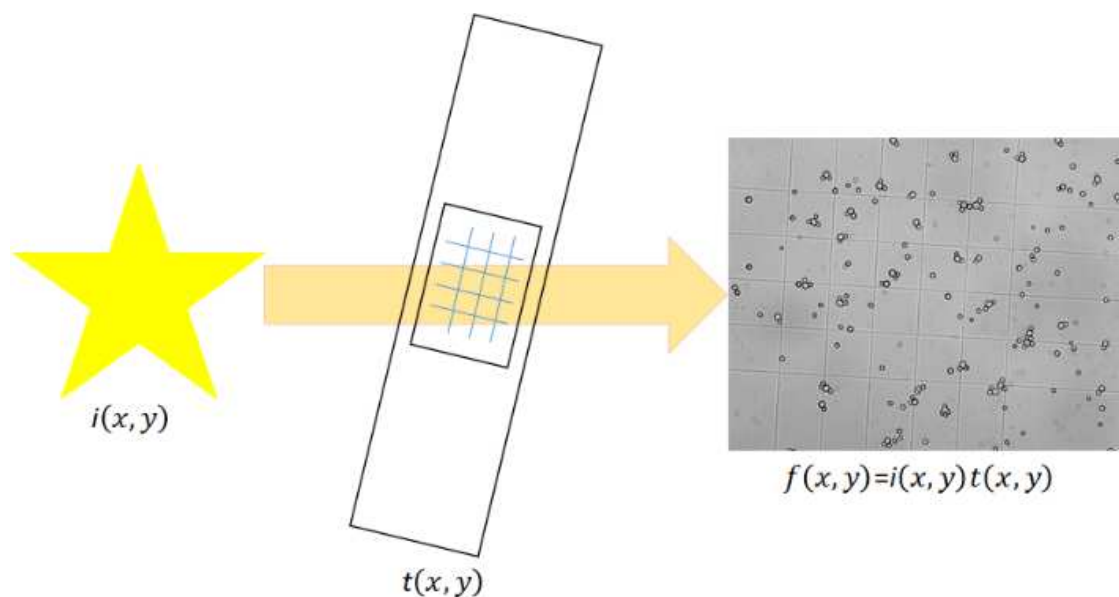


figure 37: modèle d'illumination simplifié

Ce modèle permet de décomposer la fonction « image » en deux fonctions : la première représente la source lumineuse ($i(x, y)$) alors que la deuxième représente la lumière qui traverse la lame de comptage ($t(x, y)$). On peut considérer que la lame de comptage est un élément de modulation de la lumière source (i), l'image $f(x, y)$ qui se forme sur la capteur de la caméra est le produit de ces deux fonctions.

$$f(x, y) = i(x, y)t(x, y)$$

Afin de corriger le gradient d'illumination dans l'image, nous allons faire deux hypothèses :

- 1- La source lumineuse représente le maximum de signal pouvant être reçu au niveau de la caméra. Pour les besoin du modèle, nous considérons donc que la limite de son intensité est $+\infty$:

$$0 < i(x, y) < +\infty$$

Lors de toute acquisition, l'objectif recherché est de disposer d'une source lumineuse la plus homogène possible. La première hypothèse est donc que les variations de $i(x, y)$ sont relativement faibles, autrement dit, « de basses fréquences ».

- 2- L'objet observé, placé entre la source et la caméra, représente une modulation que va subir la lumière. Dans le modèle, t , qui représente la lumière transmise, sera par conséquent une valeur comprise entre 0 et 1 représentant un objet sur la lame de comptage variant de opaque à transparent :

$$0 < t(x, y) < 1$$

La deuxième hypothèse est que l'objet observé crée les variations les plus importantes dans l'image, autrement dit, $t(x, y)$ est composé de « hautes fréquences ».

Telle quelle, l'équation $f(x, y) = i(x, y)t(x, y)$ ne permet pas de réaliser un traitement fréquentiel distinct sur l'illumination et la réflectance. En effet, la transformée de Fourier de f correspondant à la convolution des transformées de Fourier respectives de i et de t , un filtrage linéaire simple ne peut être réalisé. L'utilisation du logarithme de la fonction permet de résoudre ce problème et de traiter indépendamment la lumière source et la lumière transmise.

$$z(x, y) = \ln(f(x, y)) = \ln(i(x, y)) + \ln(t(x, y))$$

La fonction $z(x, y)$ étant constituée d'une somme de deux fonctions, il est maintenant possible d'utiliser la propriété de linéarité de la transformée de Fourier :

$$Z(u, v) = FFT(z(x, y)) = FFT(\ln(i(x, y))) + FFT(\ln(t(x, y)))$$

$$Z(u, v) = I(u, v) + T(u, v)$$

où $I(u, v)$ et $T(u, v)$ sont respectivement les transformées de Fourier de $\ln(i(x, y))$ et de $\ln(t(x, y))$. Il est alors possible de filtrer la fonction $Z(u, v)$ en la multipliant par une fonction $H(u, v)$ adaptée aux besoins, ce qui donne :

$$S(u, v) = H(u, v)Z(u, v)$$

$$S(u, v) = H(u, v)I(u, v) + H(u, v)T(u, v)$$

Si nous notons ${}_i\hat{F}$ la transformée de Fourier inverse, le résultat du filtrage de $z(x, y)$ sera noté $s(u, v)$ et sera égal à :

$$s(x, y) = {}_i\hat{F}(S(u, v))$$

$$s(x, y) = {}_i\hat{F}(H(u, v)I(u, v)) + {}_i\hat{F}(H(u, v)T(u, v))$$

$z(x, y)$ avait été obtenue en calculant le logarithme népérien de $f(x, y)$, nous prendrons donc l'exponentielle pour obtenir l'image filtrée $g(x, y)$:

$$g(x, y) = e^{s(x, y)}$$

$$g(x, y) = e^{({}_i\hat{F}(H(u, v)I(u, v)) + {}_i\hat{F}(H(u, v)T(u, v)))}$$

En utilisant les notations suivantes :

$$i'(x, y) = e^{{}_i\hat{F}(H(u, v)I(u, v))} \text{ et } r'(x, y) = e^{{}_i\hat{F}(H(u, v)T(u, v))}$$

qui sont respectivement l'illumination et la transmittance de l'image corrigée on obtient l'équation suivante :

$$g(x, y) = i'(x, y) r'(x, y)$$

Ce traitement est appelé filtrage homomorphique et est représenté schématiquement par la figure suivante (figure 38). Les spécifications du filtre homomorphique $H(u, v)$ sont alors établies de telle sorte qu'il affecte différemment les hautes et les basses fréquences. La figure 39 montre le filtre homomorphique utilisé pour notre application, compte tenu des remarques faites précédemment, ce filtre a pour but d'atténuer les basses fréquences en gardant intactes les hautes fréquences dans le but de diminuer l'influence des variations de la lumière source tout en conservant la sémantique de la lumière transmise.

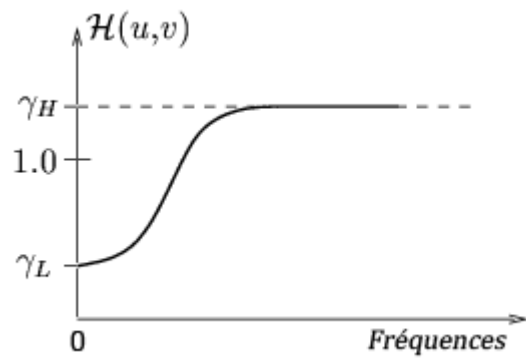
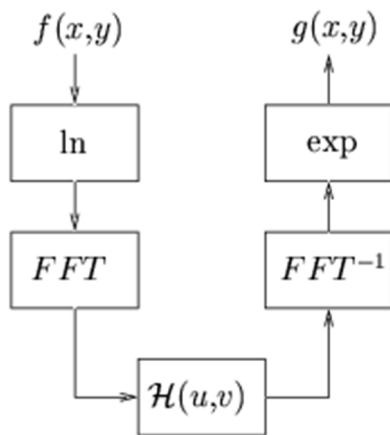


figure 39: courbe de filtrage utilisée pour le filtre homomorphique

figure 38: principe résumé du filtrage homomorphique

La figure suivante (figure 40) montre le résultat de l'application du filtre homomorphique. Le gradient d'illumination qui s'étendait du sombre dans le coin haut gauche vers le plus clair dans le coin bas droit est corrigé. Le seuillage à 50% ne montre sépare plus l'image en deux zones, sombre et claire. Nous appliquerons donc ce traitement préalable à toute la série d'images.

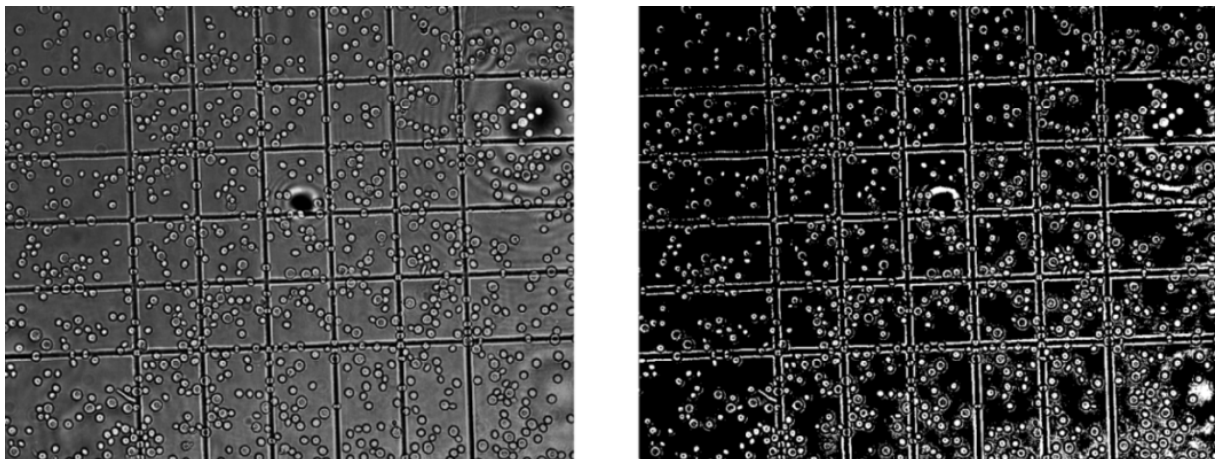


figure 40: image traitée par filtrage homomorphique (gauche), image seuillée à 50% pour illustrer l'absence de gradient d'illumination(droite)

4. Détection de la grille dans l'image

La détection de la grille de Malassez dans l'image représente la première étape dans le projet de mesure des concentrations de cellules dans les expériences menées par l'équipe PMB. Il existe très peu de travaux concernant la détection de grilles de comptage dans les images microscopiques. Des travaux récents de Chen *et al* [1] présentent une méthode basée sur les

morpho-mathématiques. La première étape de cette méthode consiste à rendre l'image binaire. Les images dont les auteurs disposent sont très contrastées et cette étape ne pose aucune difficulté (figure 41).

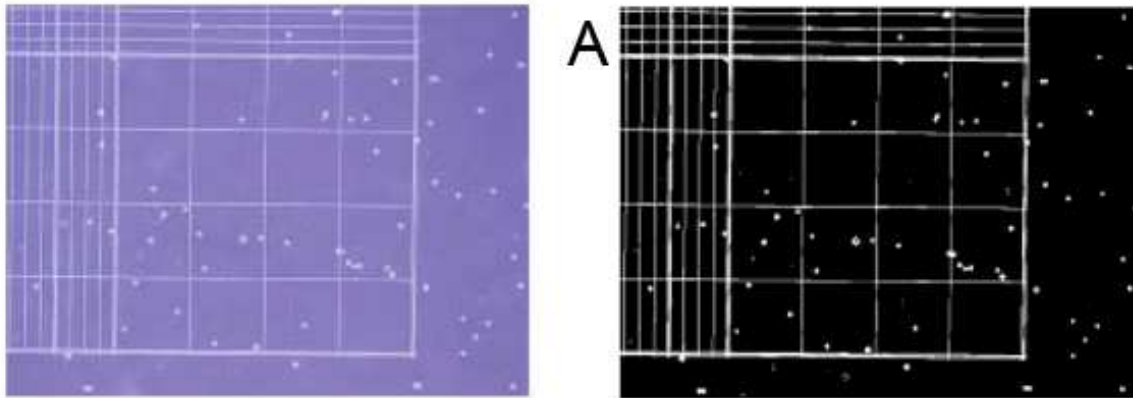


figure 41: Grille d'origine et image binarisée (A) [1]

Chen *et al* proposent ensuite d'utiliser la méthode de morphologie mathématique de « hole-filling ». Cette méthode permet de « remplir » en blanc les zones noires entièrement entourées de pixels blancs. Il en résulte une image sur laquelle l'ensemble des zones définies par la gravure de la grille de comptage sont clairement identifiées. Une deuxième utilisation de la méthode de « hole-filling » permet de « boucher » les traces des cellules présentes sur la lame de comptage. Avec les lames de comptage utilisées, la zone utile est déterminée par les 16 plus grands patches (figure 42).

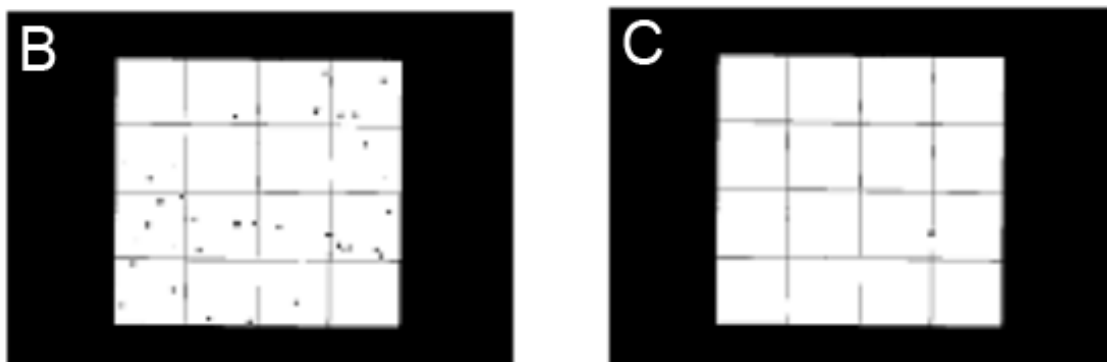


figure 42: sélection des 16 plus grandes zones (B), "hole-filling" (C) [1]

Une zone d'intérêt (Region of interest, ROI) est définie en opérant une dilatation sur les 16 plus grands patches isolés (figure 43 D). La grille est isolée via une opération binaire de type « ou exclusif » : $E = D \text{ xor } C$ (figure 43 E).

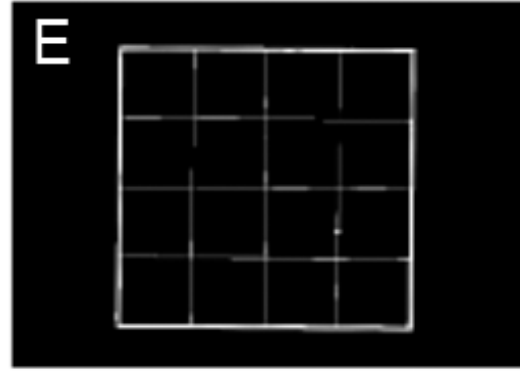


figure 43: Region d'intérêt (D), grille extraite (E) [1]

La dernière étape consiste à compter les cellules présentes dans la zone d'intérêt. La ROI (D) identifiée précédemment est utilisée pour masquer l'image binaire (A). La grille (E) est alors soustraite (figure 44).

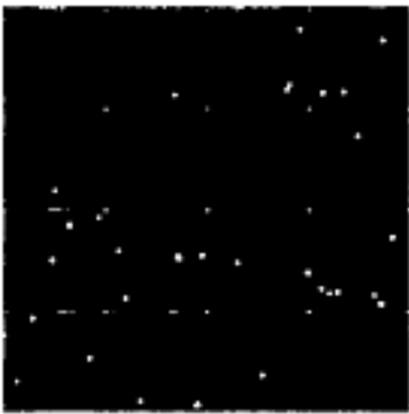


figure 44: segmentation brute des cellules présentes dans la zone d'intérêt [1]



figure 45: Segmentation après ouverture morphomathématique [1]

Une opération d'ouverture est effectuée afin de « nettoyer » les restes de la grille. Le résultat est une image ne présentant plus que les cellules présentes dans la zone d'intérêt (figure 45).

Cette méthode donne de bons résultats mais pose tout de même quelques problèmes que nous allons détailler. La qualité des images de base influe énormément sur le résultat. Dès la première étape de binarisation, un gradient d'illumination ou un bruit trop important sont des facteurs d'échec. Ces problèmes peuvent néanmoins être partiellement résolus en ajoutant les prétraitements décrit ci-dessus afin d'uniformiser et de nettoyer les images.

Une fois l'image d'origine binarisée par l'application d'un seuillage, il peut exister des zones de coupure dans le tracé de la grille, dues à la présence de cellules par exemple. La méthode de

« hole-filling » employée risque très probablement de fusionner plusieurs carrés de la zone de comptage. La méthode recherche alors les 16 plus grands patchs et risque d'ajouter un autre patch représentant à la plus grande zone restante ; le résultat final est alors faux.

La dernière étape, qui propose d'identifier les cellules présentes dans la ROI pose également un problème : La grille est retirée par soustraction, or, celle-ci n'étant pas très précisément identifiée lors des précédentes étapes, il en reste quelques traces qui sont nettoyées par l'application d'une ouverture. Cette méthode risque d'éliminer les plus petites cellules et il est difficile de garantir que la grille sera alors totalement éliminée de l'image. Lors du comptage, certaines cellules risquent donc d'être « oubliées » alors que d'autres pourraient être « créées » par confusion avec un reste de grille.

La méthode proposée par Chen et al est donc bien adaptée pour des images très contrastées et avec une densité relativement faible de cellules pour éviter au maximum les risques de masquage de la grille de comptage.

Cette méthode a été testée sur nos 137 images et a échoué dans 100% des cas à compter les cellules. Cet échec est sans doute dû à la grande variabilité des images de notre échantillon, que ce soit en termes de gradient d'illumination, de bruit ou de densité de cellules.

Il semble donc évident que les méthodes de morphologie mathématiques seules ne sont pas suffisantes pour automatiser la détection d'une grille de comptage et l'identification d'une ROI.

Nous pouvons faire 2 observations concernant la grille de comptage dans l'image :

1 : La grille est un objet composé de pixels alignés « horizontalement » et « verticalement ». Cette observation nous oriente vers l'utilisation de la transformée de Hough linéaire afin d'identifier ces alignements.

2 : La grille est un objet bi-périodique dans l'image. Cette observation nous conduit à l'utilisation de la transformée de Fourier dans laquelle il s'agirait de trouver une signature de la grille et de l'exploiter dans l'espace image.

a. Détection de la grille : Approche naïve utilisant directement la transformée de Hough

Intuitivement, nous avons vu que la grille, dans l'image, est constituée d'un ensemble de pixels présentant des alignements très caractéristiques. L'approche naïve consiste donc à utiliser

directement la transformation de Hough linéaire afin de trouver ces groupes de pixels alignés et d'en déduire le positionnement de la grille de comptage.

Dans notre étude, nous utilisons des lames de comptage de Malassez, dont la zone utile est composée de 20 carrés disposés en 4 lignes de 5. Cela nous donne un total de 11 lignes à identifier, 5 lignes horizontales et 6 lignes verticales, pour déterminer le positionnement de la grille (figure 46).

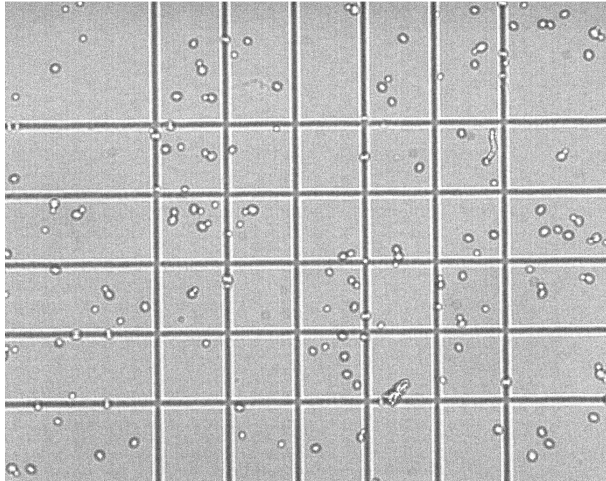


figure 46: image d'origine, culture de saccharomyces cerevisiae sur lame de Malassez

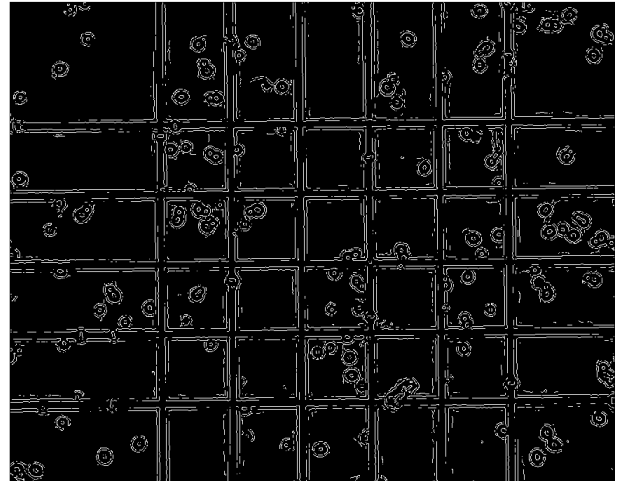


figure 47: Détection de contours avec filtre de Canny

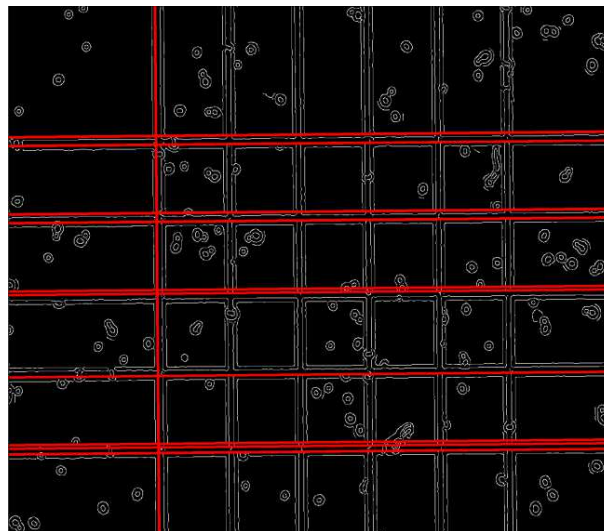


figure 48: lignes détectées par la transformée de Hough affichées en rouge, en superposition de l'image de contours obtenues par Canny

L'application directe de la transformation de Hough passe classiquement par une première étape de détection des contours qui a pour but de, 1, binariser l'image, 2, de focaliser la détection des

droites présente dans l'image sur des zones d'intérêt : les contours (figure 47). Cette étape est effectuée à l'aide d'un filtre de Canny [58].

La transformation de Hough linéaire est appliquée sur l'image de contours obtenue et les 11 droites les plus longues sont retenues. La figure 48 montre les 11 droites ainsi obtenues en superposition sur l'image de contours.

Ce résultat montre que les lignes identifiées par cette approche directe ne déterminent manifestement pas la grille de comptage. La plupart des barreaux de grille horizontaux sont doublés, voire triplés, et un seul barreau vertical est identifié. Ceci s'explique par la conjonction de deux facteurs, le premier est assez évident et concerne la géométrie rectangulaire de l'image qui permet des alignements horizontaux plus longs. Le second facteur est le tracé de chaque barreau de grille : En zoomant sur un barreau, il apparaît que sa structure est plus complexe qu'une simple ligne de pixel. Chaque barreau est composé d'une succession de trois bandes claires et sombres (figure 49), ce qui crée quatre lignes de gradient par barreau lors de l'application d'un filtre détecteur de contours.

Dans l'espace de la transformée de Hough, la structure des barreaux donne quatre pics rapprochés pour chacun (figure 50). En fonction de la taille de la zone d'exclusion autour de chaque pic et de son intensité, le résultat obtenu est finalement relativement « aléatoire », doublant ou triplant quelques barreaux.

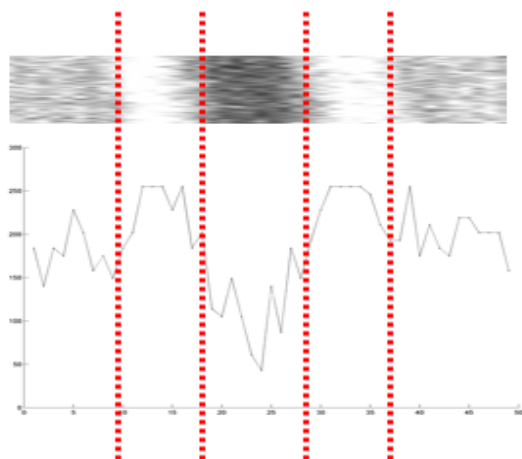


figure 49: profil type d'un barreau de la grille

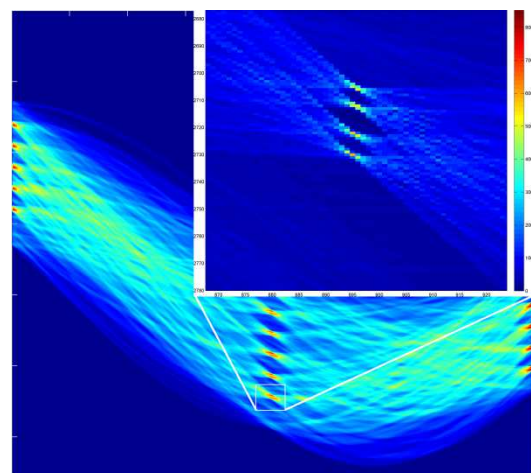


figure 50: Zoom sur une zone de convergence de l'accumulateur, un pic se sépare en 4 "sous-pics" correspondant aux 4 lignes parallèles de chaque barreau

Le problème pourrait être contourné en cherchant les 44 pics les plus importants dans l'espace de la transformée de Hough. La taille de la zone d'exclusion après sélection d'un pic pose alors problème car il est très délicat de trouver le bon paramétrage, suffisamment large pour éliminer l'ensemble du pic même si celui-ci est diffus et suffisamment étroit pour ne pas éliminer un pic voisin représentant une ligne parallèle très proche dans l'espace image. Dans la pratique, il est très difficile de trouver le réglage optimal permettant de trouver les 44 lignes voulues et ce réglage doit être fait manuellement en fonction de chaque image, en fonction de l'échelle de la grille et de la qualité de l'acquisition. On s'éloigne donc rapidement de l'objectif d'automatisation et de robustesse pour la détection et la caractérisation de la grille.

Dans l'exemple montré en figure 51, l'approche naïve fonctionne correctement car le réglage de la zone d'exclusion permet d'identifier les quatre lignes définissant chaque barreau. A contrario, dans les exemples montrés en figure 52, le réglage de la zone d'exclusion ne permet clairement pas d'identifier quatre lignes par barreau. En haut, dans les barreaux verticaux « gauches » sont triplés, en bas, l'étréitesse des barreaux fait que, même avec une zone d'exclusion particulièrement étroite, des lignes sont oubliées.

Nous constatons donc que l'approche naïve reposant uniquement sur la transformée de Hough est très clairement insuffisante s'il s'agit d'automatiser la détection et de caractérisation de la grille de comptage afin d'en déduire une ROI. Il est donc nécessaire de trouver une approche alternative robuste pour automatiser cette détection.

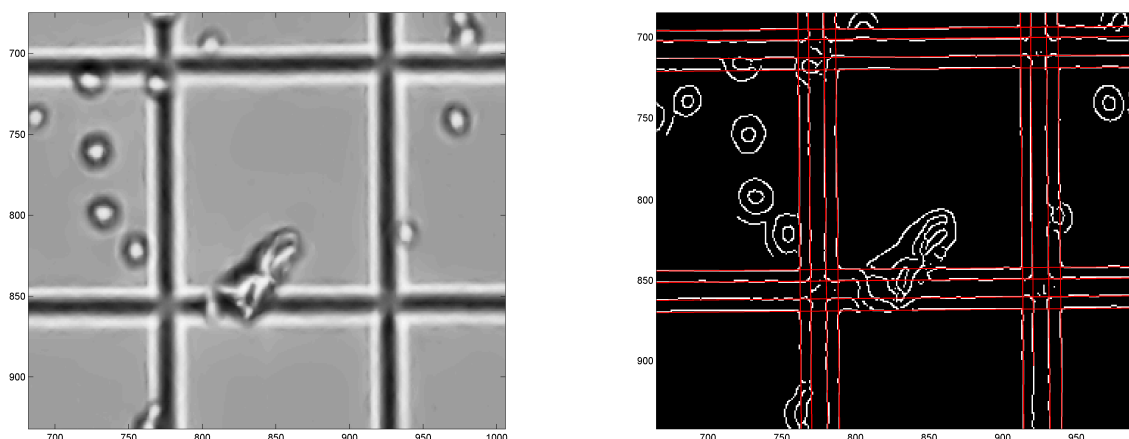


figure 51: exemple de réussite pour la détection de 4 lignes parallèles pour chaque barreau

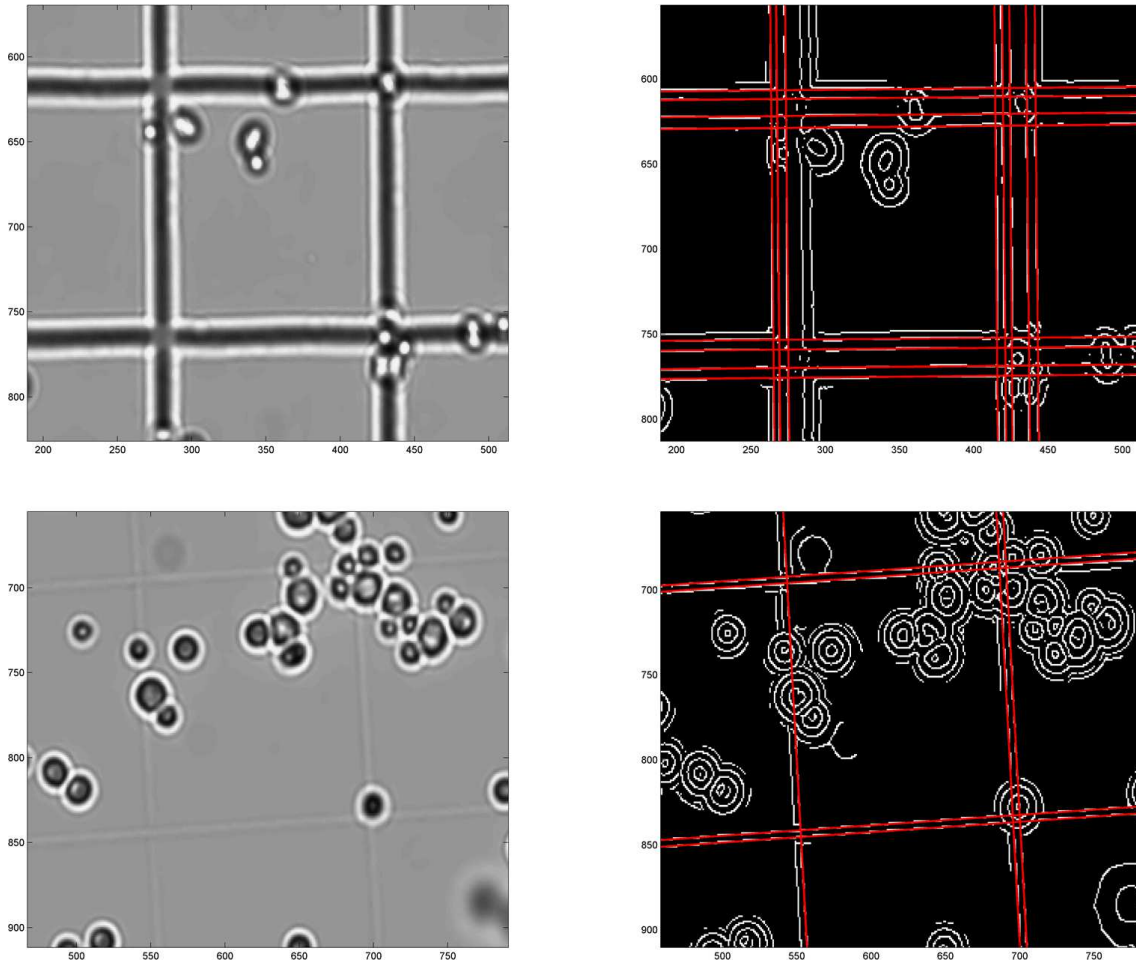


figure 52: exemples d'echecs dans la détection de 4 lignes par barre

b. Détection de la grille : approche fréquentielle basée sur la transformée de Fourier

Nous venons de voir que l'approche directe par la transformée de Hough est insuffisante pour détecter correctement la grille de comptage dans l'image. Il est alors intéressant de s'appuyer sur la périodicité de la grille dans l'image pour améliorer la qualité et la robustesse de sa détection.

La première étape est de calculer la transformée de Fourier de l'image d'origine. Dans l'image des modules de la transformée de Fourier centrée, un motif en forme de croix est visible, on peut remarquer que ce motif a la même orientation que la grille dans l'image (figure 53).

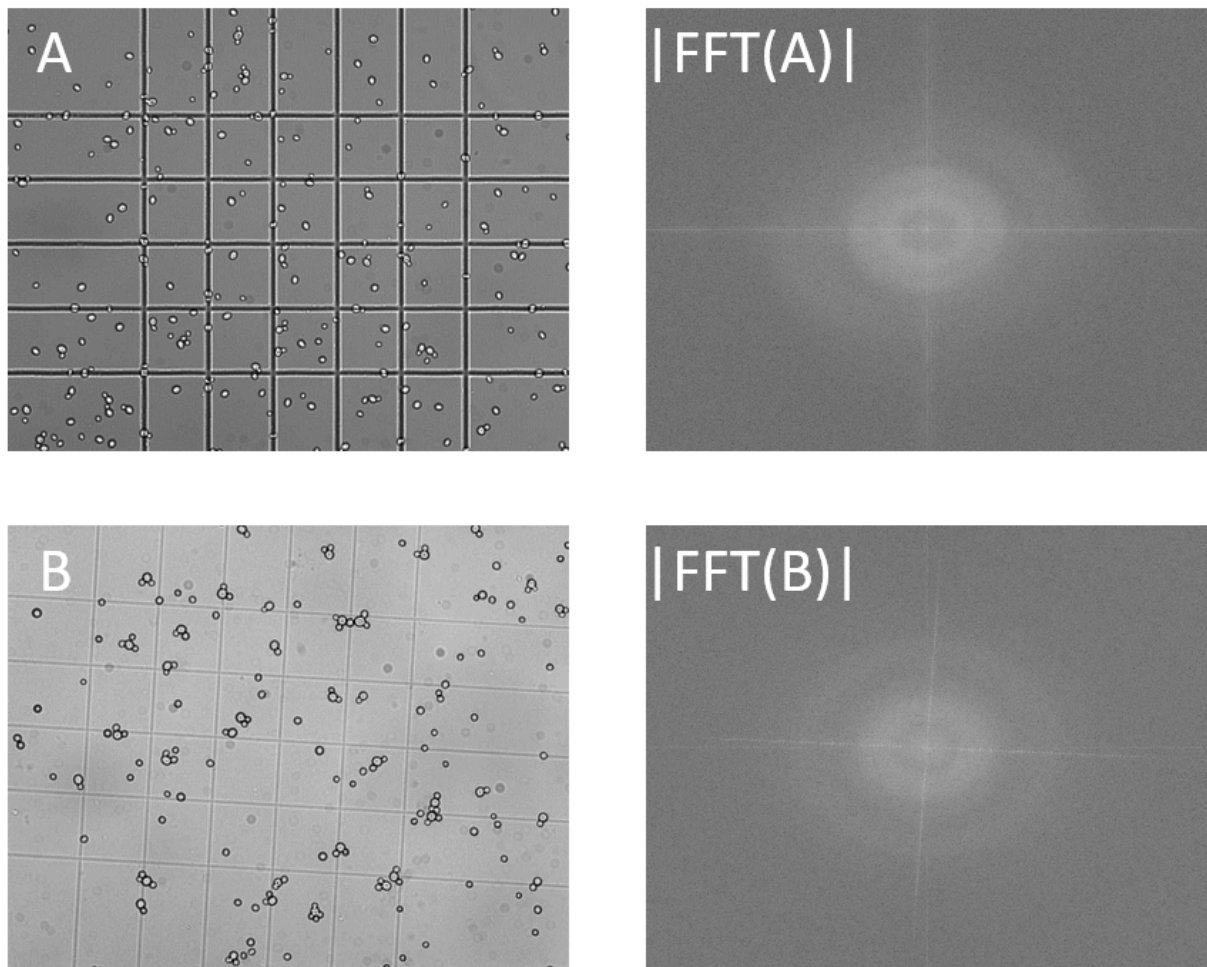


figure 53: images d'origine (A et B) et le module de leur FFT

Nous allons alors utiliser la transformée de Hough dans l'image des modules de la transformée de Fourier afin de trouver les paramètres de ces alignements caractéristiques de hauts modules.

L'ensemble des points de la transformée de Fourier défini par ces deux alignements est alors extrait en utilisant l'algorithme de Bresenham pour déterminer les pixels à prendre en compte selon les paramètres trouvés avec la transformée de Hough précédente. Nous calculons ensuite une transformée de Fourier inverse réduite à ces deux alignements.

Le résultat est le tracé d'une image relativement propre de la grille de comptage pour les grilles orientées suivant les axes de l'image. Pour les grilles inclinées, on obtient le tracé de la grille ainsi que quelques artefacts faisant écho aux barreaux réels (figure 54).

Ce résultat montre que le motif en forme de croix dans l'espace des modules de la transformée de Fourier constitue une sorte de signature de la grille de comptage présente dans les images.

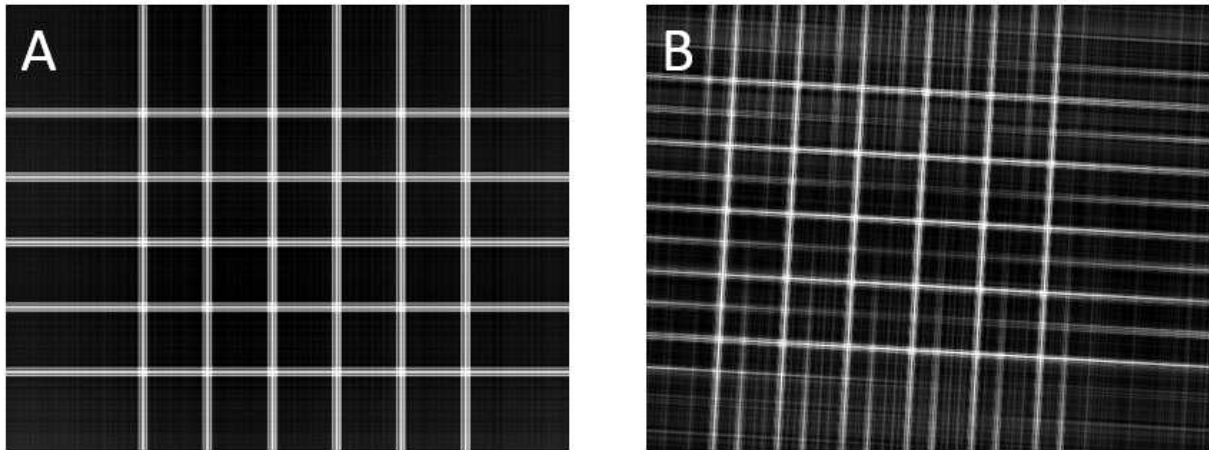


figure 54: Grilles extraites pour les images A et B

En conclusion, en se basant sur une approche fréquentielle pour la détection de la grille, il est possible d'identifier une signature de celle-ci dans l'image des modules de la transformée de Fourier. En extrayant de la transformée de Fourier les points caractéristiques de cette signature et en procédant à une transformation inverse sur ceux-ci, il est possible de générer une image propre de la grille lorsque celle-ci ne présente pas de problème d'orientation, c'est-à-dire, lorsque la grille a la même orientation que les pixels de l'image. En cas de rotation de la grille dans l'image, il semble que l'extraction de la signature manque de précision, ceci est dû à la conjonction de 2 facteurs :

- Les réglages de la transformée de Hough qui ne peuvent en aucune manière être « parfaits » et induisent nécessairement une légère imprécision dans les paramètres des 2 alignements dans l'espace des modules.
- L'application de l'algorithme de Bresenham [59] pour la sélection des points dans la transformée de Fourier : lorsque la grille est inclinée dans l'image, la signature l'est également dans la transformée de Fourier. L'algorithme de Bresenham a pour but de créer une ligne de pixel « propre », sans dédoublement, ce qui implique un « choix » lorsque la ligne directrice est inclinée et induit un passage d'une ligne de pixels à une autre. Ce choix, basé sur la « part de pixel » couverte par la ligne directrice, n'est pas forcément pertinent par rapport à la signature recherchée

c. Optimisation du calcul de la transformée de Fourier discrète et de la recherche de signature

Nous avons déterminé que l'utilisation d'un ensemble d'optimisations pouvaient être réalisées dans le calcul de la transformée de Fourier discrète (DFT) et dans la recherche de la signature de la grille.

i. Fenêtrage de l'image pour le calcul de la DFT

L'algorithme optimisé de calcul de la DFT, appelé FFT (Fast Fourier Transform [50]) est basé sur une réplication de l'image (figure 55 A, B). Cette réplication induit une discontinuité aux frontières entre les quatre répliques. Cette discontinuité importante génère dans l'image des modules de la FFT un motif en forme de croix parallèle aux axes de l'image (figure 55 C). Ce motif peut évidemment générer des échecs dans la détection de la signature de la grille. La solution consiste en l'application d'un fenêtrage sur l'image d'origine. Il existe plusieurs types de fenêtrages, Hamming, Hanning, Barlett, Blackman ou encore Kaiser [60]. Chacun a pour objectif d'adoucir la transition au bords des images dupliquées. Pour notre application, nous avons utilisé une fenêtre de Blackman qui passe les bords de l'image à zéro de manière « lisse » (figure 55 D, E), supprimant ainsi totalement la discontinuité due à la méthode de calcul de la FFT. Le motif parasite disparaît bien de la FFT opérée sur l'image fenêtrée (figure 55 F)

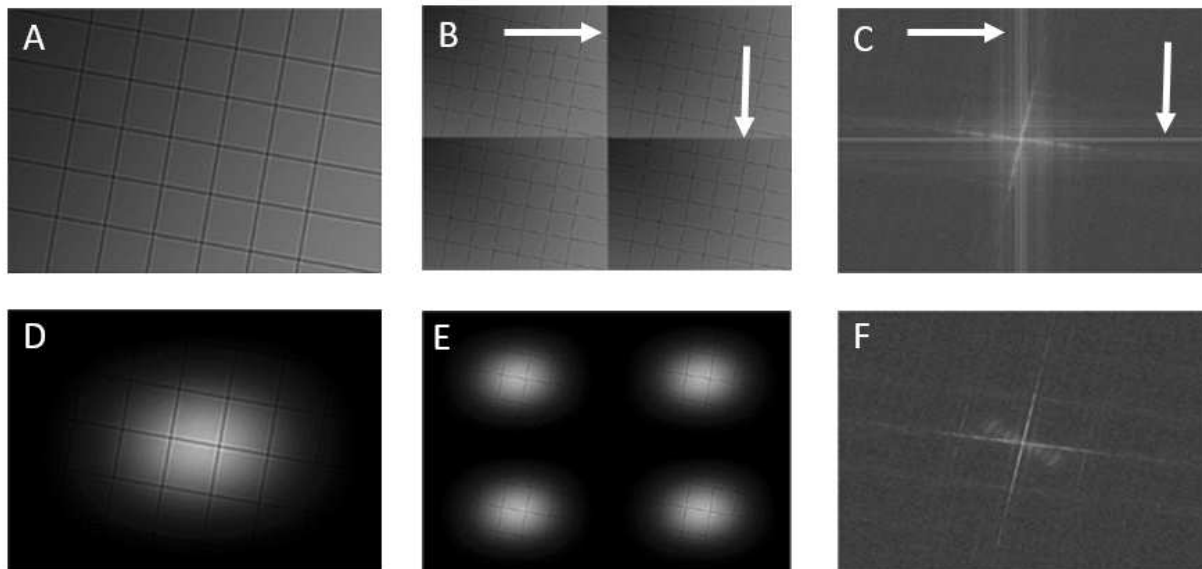


figure 55: image d'origine (A), composition utilisée pour le calcul optimisé de la FFT (B), FFT sans fenêtrage (C), image d'origine fenêtrée (D), composition obtenue avec l'image fenêtrée (E), FFT avec fenêtrage (F)

ii. Augmentation de contraste dans la FFT

Dans certaines images, il apparait que la grille est très peu contrastée. Ceci se ressent dans l'image des modules de la FFT avec une signature difficilement identifiable. Il est possible d'augmenter artificiellement le contraste de l'image d'origine afin de faciliter la recherche de la signature dans l'espace des modules de la FFT. La figure 56 montre un exemple d'image avec une grille peu contrastée (a), la même image avec un contraste poussé au maximum (b) et les images de module de FFT correspondants (c, d).

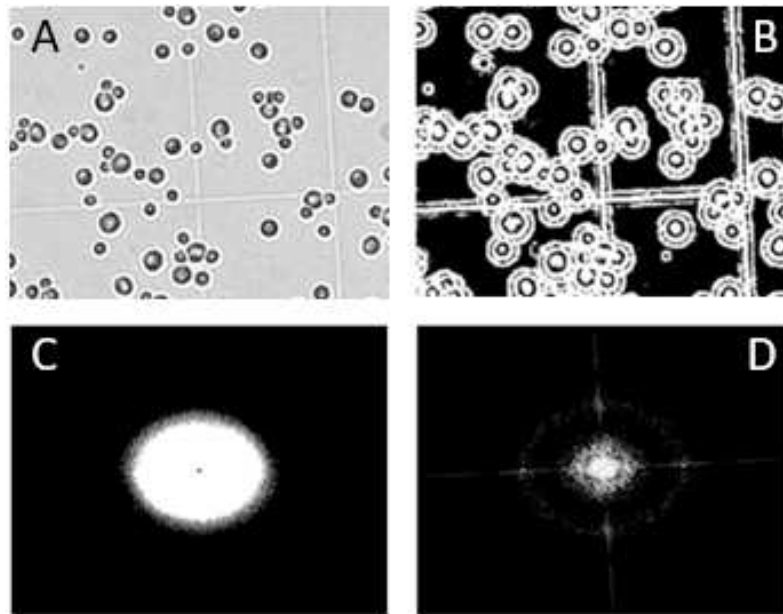


figure 56: image d'origine (A), contraste maximisé (B), FFT de l'image d'origine (C), FFT de l'image contrastée (D)

Ces optimisations nous permettent de garantir la détection de la signature de la grille pour l'ensemble des images mais également d'améliorer la précision de cette détection. Il s'agit maintenant d'en extraire l'ensemble des paramètres pertinent.

5. Caractérisation de la grille

Nous avons vu précédemment comment extraire la signature de la grille via la transformée de Fourier. Le but de la caractérisation de la grille de comptage est de déterminer précisément la position de chacun des barreaux puis d'en déduire la zone d'intérêt dans laquelle sera effectué le comptage des cellules. La détermination précise de la position des barreaux permet également d'introduire une évaluation automatique de la qualité du résultat obtenu et éventuellement d'écarter automatiquement un résultat absurde dû à un échec lors d'une étape.

Pour la caractérisation de la grille, nous partons de l'image de grille extraite lors de l'étape de détection. Il s'agit de déterminer les paramètres de chaque barreau, là encore la transformée de Hough linéaire s'impose comme la méthode adaptée. Néanmoins, son application naïve à l'image de grille obtenue lors de sa détection, bien qu'elle pose moins de problème qu'en partant de l'image brute en offrant la possibilité d'utiliser une valeur importante pour le voisinage d'exclusion lors de la recherche de pics (paramètre `NHoodSize` dans la fonction `Matlab®`), pose tout de même des problèmes évidents de précision que nous illustrons dans l'exemple suivant (figure 57).

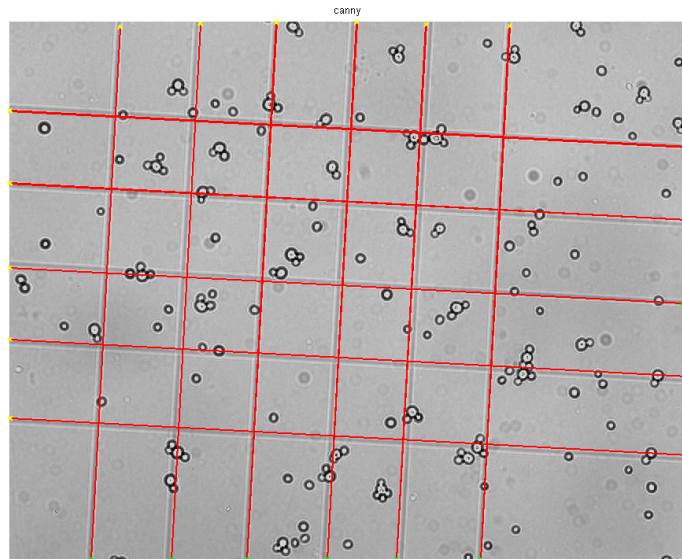


figure 57: lignes extraites avec la transformée de Hough appliquée directement sur l'image de grille extraite

Sur cet exemple (figure 57), l'application de la transformée de Hough à l'image de la grille seule permet de détecter correctement les 6 barreaux verticaux et les 5 barreaux horizontaux. Néanmoins, il apparaît immédiatement un problème de précision dans le positionnement des lignes qui se positionnent aléatoirement d'un côté ou de l'autre de chaque barreau, voire en « diagonale » dans le barreau. Au finale, la grille déterminée est très irrégulière. Ce résultat n'est donc pas satisfaisant.

a. Qu'est-ce qu'un bon positionnement pour un barreau de grille ?

Nous avons vu précédemment que chaque barreau de grille n'est pas composé d'une ligne unique mais d'une succession de trois zones alternativement sombres et claires (figure 49). La zone centrale indique la zone creuse dans la gravure de la grille alors que les deux zones

périphériques semblent être dues aux réflexions de lumière sur les parties inclinées entre le fond du sillon et la surface de la lame de comptage.

Nous considérons que le positionnement d'un barreau de grille est défini par le centre du sillon de gravure, c'est-à-dire par le centre de la zone centrale dans l'image.

Les étapes suivantes ont donc pour but de retravailler l'image de la grille afin de permettre à la transformée de Hough de détecter le centre de chaque barreau. Le fond de l'image de la grille obtenue par filtrage de la transformée de Fourier présente quelques artefacts. Ces artefacts sont nettoyés en utilisant la méthode morpho-mathématique « top hat » (voir annexe 1) qui permet d'éliminer les plus petits éléments du fond de l'image. L'image de la grille est ensuite seuillée pour binariser l'image. Une ouverture morpho-mathématique permet d'éliminer les dernières traces du fond et une dilatation permet de fusionner les trois éléments constituant chaque barreau. Le résultat intermédiaire est une image très grossière mais également très régulière de la grille de comptage. Une opération de squelettisation est appliquée sur cette image de grille grossière (figure 58).

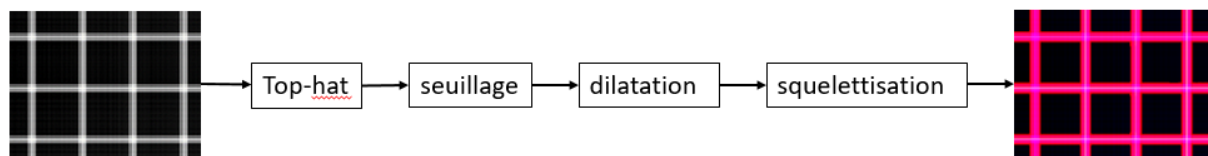


figure 58: opérations morphomathématiques pour obtenir le squelette de la grille extraite

Les figures suivantes (figure 59) montrent en rose la grille grossière obtenue, dans le cas « idéal » où la grille est orientée parallèlement aux axes de l'image et dans le cas moins favorable où elle est légèrement pivotée. Le « squelette » obtenu est figuré en blanc.

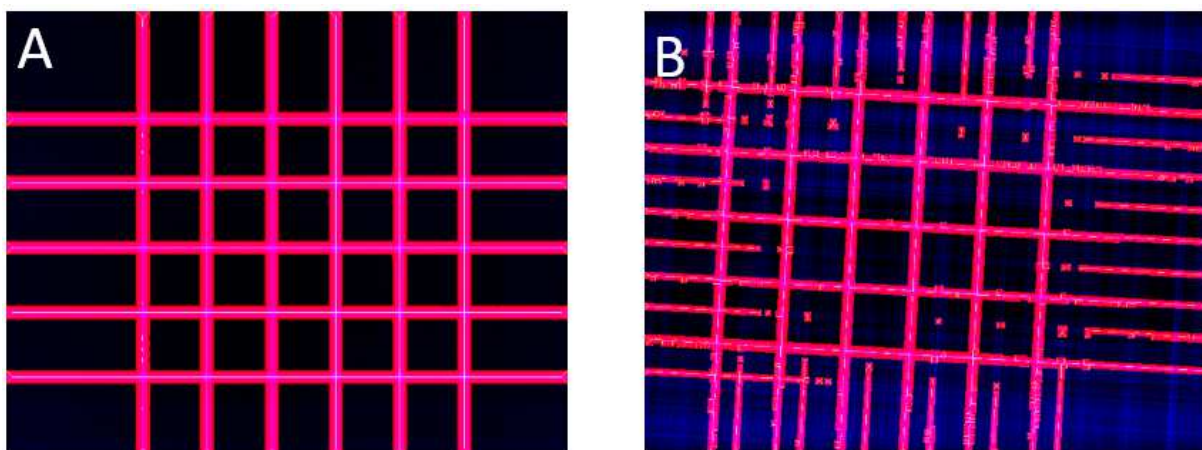


figure 59: Grilles extraites dilatées (rose) puis squelettisées (blanc) pour les images A et B

La transformée de Hough est appliquée sur le squelette et permet d'obtenir les paramètres des onze lignes déterminant la grille. Les lignes extérieures déterminent la ROI de la grille de comptage. Ces 11 lignes sont représentées dans les figures suivantes, en vert, les barreaux intérieurs, en rouge, les barreaux désignant la ROI (figure 60) :

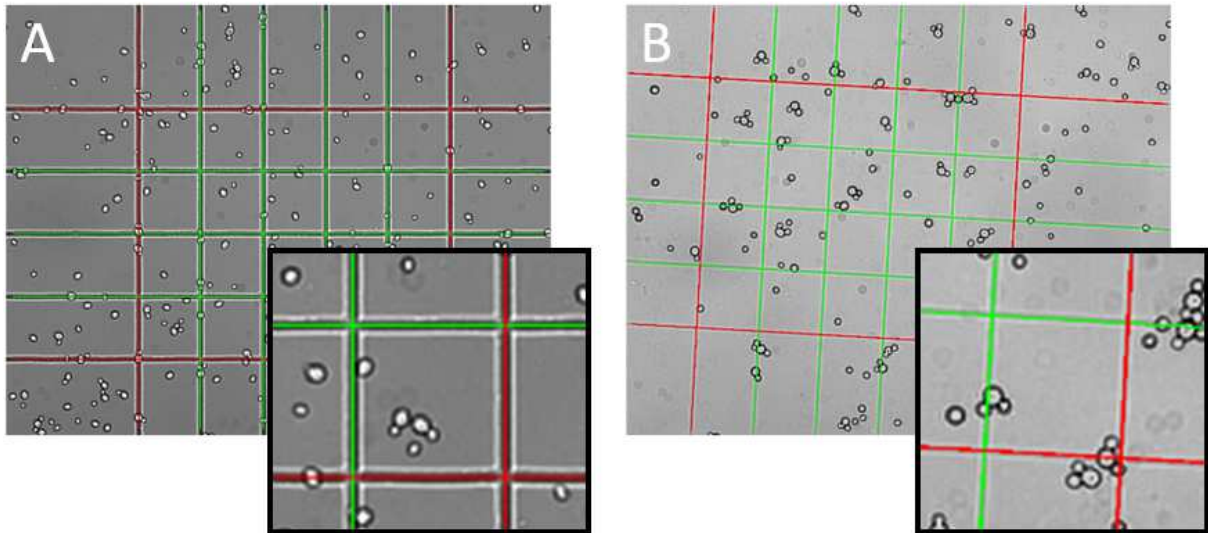


figure 60: images d'origines, la grille est superposée en vert (rouge pour les barreaux extérieurs définissant la ROI)

Visuellement, ce résultat semble meilleur que le résultat obtenu en appliquant directement la transformée de Hough à l'image de la grille : Les lignes sont centrées sur le creux de chaque barreau.

b. Evaluation de la qualité du positionnement des barreaux de la grille

Une image de grille parfaite a été construite afin de servir de référence pour évaluer la qualité de la méthode de caractérisation de la grille de comptage. Pour construire cette grille de référence, la section d'un barreau a été extraite d'une image particulièrement nette de notre échantillon. Cette section de barreau a ensuite été dupliquée le long de 11 lignes parfaitement disposées pour définir une grille synthétique sans défaut (figure 61).

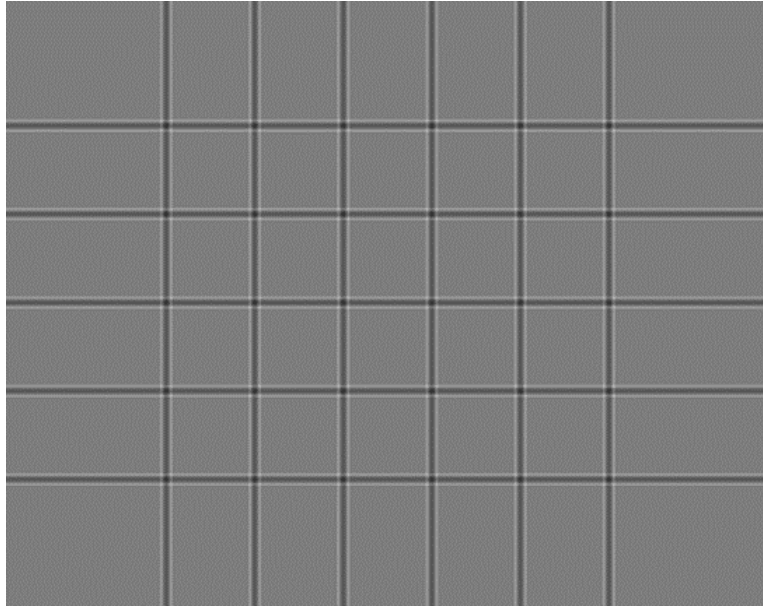


figure 61: Grille synthétique de référence

Nous venons de voir que l'approche fréquentielle combinée à un nettoyage de l'image de la grille obtenue avant l'application de la transformée de Hough linéaire permet « visuellement » de positionner chaque ligne de la grille très précisément. Ce critère visuel est insuffisant et il s'agit de mesurer la précision de l'ajustement de la grille de comptage par ces 11 lignes paramétriques.

Nous pouvons nous baser sur la géométrie de la grille pour évaluer la qualité du positionnement des lignes paramétriques :

- La grille est composée de 20 carrés disposés en 4 lignes de 5. Il est donc facile de déduire que la ROI rectangulaire déterminée par les lignes extérieures doit avoir un ratio largeur/longueur égal à 4/5.
- Par construction, les 20 carrés de la grille ont une surface égale. On peut mesurer le coefficient de variation de la surface des carrés délimités par les 11 lignes. Idéalement, les lignes étant parfaitement positionnées, ce coefficient de variation doit être nul.

$$C_v = 100 \frac{\sigma}{\mu}$$

La grille synthétique nous a servi dans un premier temps à vérifier que le ratio mesuré de la ROI est bien 0.8 et que le coefficient de variation de la surface des carrés de comptage est bien 0.

Dans le cas réel, en fonction de la qualité de l'image d'origine, le coefficient de variation ne s'annule que rarement. Il est donc très intéressant d'utiliser cette grille et de la modifier afin de donner une signification physique à la valeur de coefficient de variation, pour que ce dernier donne une indication sur « la quantité » d'erreur dans la caractérisation.

Nous avons donc déplacé les barreaux de la grille de 1 ou plusieurs pixels et mesuré le coefficient de variation (tableau 1). Le déplacement d'un barreau horizontal est noté E_1 et d'un barreau vertical E_c . Le déplacement « total », que l'on considérera comme l'erreur de placement globale, est mesuré en prenant l'hypoténuse d'un triangle rectangle dont les 2 côtés de l'angle droit seraient les déplacements horizontaux et verticaux.

tableau 1: estimation de l'erreur de positionnement de la grille en fonction du coefficient de variation obtenu

E_c	E_1	$\sqrt{E_c^2 + E_1^2}$	C_v
0	0	0	0
0	1	1.00	0.45
1	0	1.00	0.51
1	1	1.41	0.68
0	2	2.00	0.91
2	0	2.00	1.01
2	2	2.83	1.36
0	5	5.00	2.27
5	0	5.00	2.54
5	5	7.07	3.40
0	10	10.00	4.54
10	0	10.00	5.07
10	10	14.14	6.81
0	15	15.00	6.81
15	0	15.00	7.61
15	15	21.21	10.22

Le tableau 1 nous permet de créer un abaque de la qualité du résultat obtenu lors de la caractérisation de la grille. Dans le cas des images réelles, nous avons considéré qu'une erreur de placement cumulée de 2 pixels représente un résultat « parfait », qu'une erreur cumulée comprise entre 2 et 5 pixels représente un excellent résultat, qu'entre 5 et 10 pixels, le résultat est bon, qu'une erreur cumulée de 10 pixels ou moins représente un résultat convenable et enfin, qu'une erreur cumulée supérieur à 10 pixels représente un échec.

En résumé :

- $C_v < 1$: Grille parfaitement positionnée
- $1 \leq C_v < 2$: Grille très bien positionnée
- $2 \leq C_v < 5$: Grille bien positionnée
- $C_v \geq 5$: Grille mal positionnée ou non détectée

La figure 62 montre l'exemple d'une image et de la grille détectée et caractérisée. Pour cet exemple, le coefficient de variation est de 0,9 (grille considérée comme parfaite).

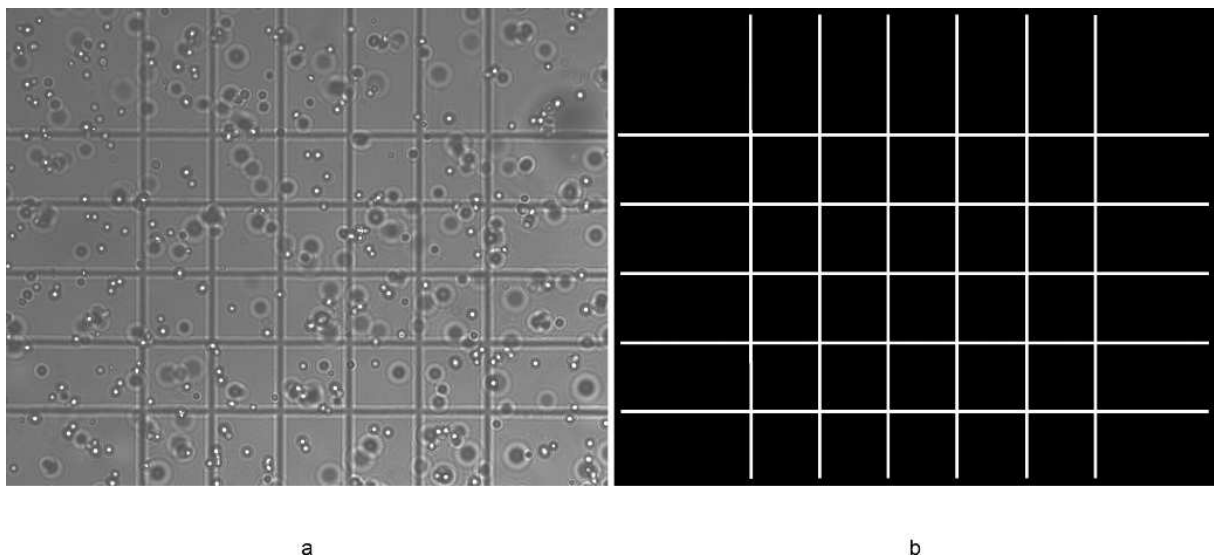


figure 62: image d'origine et grille détectée avec un coefficient de variation de 0,9 (détection considérée comme parfaite)

c. Robustesse de la caractérisation de la grille

La robustesse de la caractérisation de la grille a été testée en ajoutant des perturbations à la grille synthétique.

i. Facteur d'échelle

La grille synthétique a été redimensionnée avec plusieurs facteur d'échelle(FE) compris entre 1 et 1,32. Le redimensionnement se fait à l'aide d'une méthode classique basée sur une interpolation bilinéaire.

tableau 2: Coefficient de variation et ROI en fonction du facteur d'échelle

FE	C_v	Ratio ROI
100%	0	0.8
101%	0.5	0.8
102%	0	0.8
104%	0	0.8
108%	0	0.8
116%	0	0.8
132%	0	0.8

Le tableau 2 montre les résultats obtenus pour chaque facteur d'échelle appliqué. On observe que le ratio mesuré de la ROI n'est pas impacté par ce changement d'échelle alors que le coefficient de variation montre une légère erreur pour un facteur d'échelle de 1,01 qui peut, à la vue des autres résultats, être imputé à la précision de la méthode de redimensionnement par interpolation bilinéaire. On peut déduire de ce tableau que la méthode de caractérisation de la grille n'est pas sensible au changement d'échelle. Ce résultat s'explique par la nature de la signature de la grille : dans l'espace fréquentiel, la signature est d'une forme constante (deux lignes large d'un seul pixel) quelle que soit sa taille, qui n'influe donc pas sur la précision de la caractérisation.

ii. Intensité lumineuse

L'intensité de l'image d'origine a été modifiée en appliquant un coefficient (C) multiplicatif à la grille synthétique afin qu'elle soit sous ou sur exposée artificiellement.

tableau 3: Coefficient de variation et ROI en fonction de l'illumination

C	C_v	Ratio ROI
1/32	0	0.8
1/16	0	0.8
1/8	0	0.8
1/4	0	0.8
1/2	0	0.8
1	0	0.8
2	0	0.8

Le tableau 3 montre que le changement d'intensité lumineuse de l'image n'influe pas sur la qualité de la caractérisation de la grille dans l'image. Pour chaque coefficient appliqué, aucune

variation de Cv ni de ROI n'est constaté, malgré une saturation constatée aux extrêmes. La variation globale de l'intensité lumineuse, tant que la saturation reste mesurée, n'influe pas sur la structure de l'image elle-même : l'espace fréquentiel est donc très peu impacté par ces changements. En absence de saturation, seule la valeur centrale de la FFT, qui représente la moyenne de l'image, sera modifiée, ce qui ne peut perturber la méthode de détection et de caractérisation.

iii. Orientation de la grille dans l'image

Nous avons fait subir des rotations allant de 1 à 32° à la grille synthétique, au-delà de 32°, une partie de la grille sort du cadre de l'image.

tableau 4: Coefficient de variation et ROI en fonction de l'orientation de la grille

Angle (°)	C_v	Ratio ROI
1	0.39	0.8
2	0.5	0.8
4	0.28	0.8
8	0.91	0.8
16	0.33	0.8
32	0.46	0.799

La rotation de la grille dans l'image induit une légère erreur de positionnement (tableau 4).

Le coefficient de variation reste très faible et ses valeurs ne sont pas proportionnelles à l'angle appliqué, ce qui semble normal étant donné que la rotation de l'image d'origine n'a pour impacte qu'une rotation du même angle de la signature dans l'espace fréquentiel. Le coefficient de variation devrait donc rester nul et les petites variations constatées sont dues aux approximations de tracé liées à la nature discrète de l'image.

iv. Flou gaussien

Le flou gaussien est caractérisé par son écart type. Nous l'avons ajouté à la grille synthétique avec cinq niveaux d'écart type, de 1 à 16.

tableau 5: Coefficient de variation et ROI en fonction de la netteté de l'image

Flou (σ)	C_v	Ratio ROI
1	0	0.8
2	0	0.8
4	0	0.8
8	0	0.8
16	0.12	0.8

L'ajout de flou dans l'image synthétique ne modifie pas les résultats obtenus (C_v nul et ROI=0.8) sauf pour la plus grande valeur de celui-ci pour laquelle on constate une très légère déviation du coefficient de variation que nous pouvons négliger. Le flou va influencer sur les fréquences de l'objet « grille » mais pas sur leur orientation, par conséquent, la signature obtenue dans l'espace fréquentiel sera constante. Nous pouvons donc conclure que le flou de l'image n'influe pas sur la qualité du résultat dans le placement des barreaux de la grille (tableau 5).

v. **Contraste**

Un facteur C variant de -0,5 à 0,5 permet d'ajuster le contraste de l'image. Les niveaux de gris de celle-ci sont mappés sur des valeurs variant de C à 1-C.

tableau 6: Coefficient de variation et ROI en fonction du contraste

C	C_v	Ratio ROI
-0.35	0	0.8
-0.25	0	0.8
-0.15	0	0.8
-0.05	0	0.8
0	0	0.8
0.05	0	0.8
0.15	0	0.8
0.25	0	0.8
0.35	0	0.8

La modification du contraste de l'image n'influe pas sur la caractérisation de la grille (tableau 6). L'absence d'impact du contraste sur la qualité de la caractérisation s'explique pour les mêmes raisons que pour la modulation de l'intensité lumineuse : la modification du contraste

ne change pas la structure de l'image elle-même et n'a donc aucun impact sur la recherche de la signature dans l'espace fréquentiel.

vi. Bruit gaussien

L'ajout de bruit gaussien est déterminé par son écart type. Nous avons utilisé neuf écarts types variant de 0,01 (très faiblement bruité) à 2,56 (bruit très important).

tableau 7: Coefficient de variation et ROI en fonction du bruit

Bruit (σ)	C_v	Ratio ROI
0	0	0.8
0.01	0	0.8
0.02	0	0.8
0.04	0	0.8
0.08	0	0.8
0.16	0.45	0.8
0.32	0	0.8
0.64	0.32	0.798
1.28	1.94	0.796
2.56	2.29	0.793

Ce tableau (tableau 7) montre qu'il faut un niveau de bruit très important pour perturber la caractérisation de la grille et perdre en précision. Malgré tout, les résultats restent de bonnes qualité même avec une image d'origine très fortement dégradée. Par nature, le bruit est un élément de haute fréquence alors que la grille elle-même est un élément de basses fréquences. Avec un niveau de bruit très important, le signal de l'image elle-même finit par être masqué est c'est à partir de là que la qualité de la détection et de la caractérisation diminue. La problématique est alors de savoir si on recherche une grille dans une image de grille perturbée par un bruit aléatoire ou si on la recherche dans un signal aléatoire perturbé par une image, le second cas étant dégénéré.

Il nous est donc possible de dire que la méthode de caractérisation de la grille basée sur l'analyse fréquentielle s'accommode très bien de tous les types de perturbations pouvant être rencontrés lors de l'acquisition.

d. Résultats

Nous avons appliqué la méthode de détection puis de caractérisation de la grille pour 135 des 137 images de notre échantillon ; nous avons éliminé deux images inexploitable pour lesquelles la grille est tronquée suite à une erreur de cadrage. Lors de nos premiers travaux [61], nous présentions la méthode d'extraction et de caractérisation de la grille en partant des images brutes (pas de prétraitement) et sans optimisation pour la détection de la signature dans la transformée de Fourier. C'est ce que nous appelons la méthode originale (figure 63, Original algorithm).

En appliquant ces optimisations au niveau des images d'origine et de la détection de la signature de la grille, nous obtenons une nette amélioration du coefficient de variation moyen (figure 63, Optimized algorithm). Néanmoins, compte tenu de la grande variabilité dans les images d'origine, il apparait que ces optimisations, prises image par image, n'améliorent pas toujours la caractérisation de la grille, voire, dans certains cas, détériorent légèrement le résultat. La méthode étant capable de s'auto évaluer grâce au coefficient de variation, nous n'allons donc conserver que le meilleur des 2 résultats. Le graphique suivant (figure 63) présente les résultats obtenus avec la méthode de base, la méthode optimisée et la combinaison des deux pour obtenir le meilleur résultat :

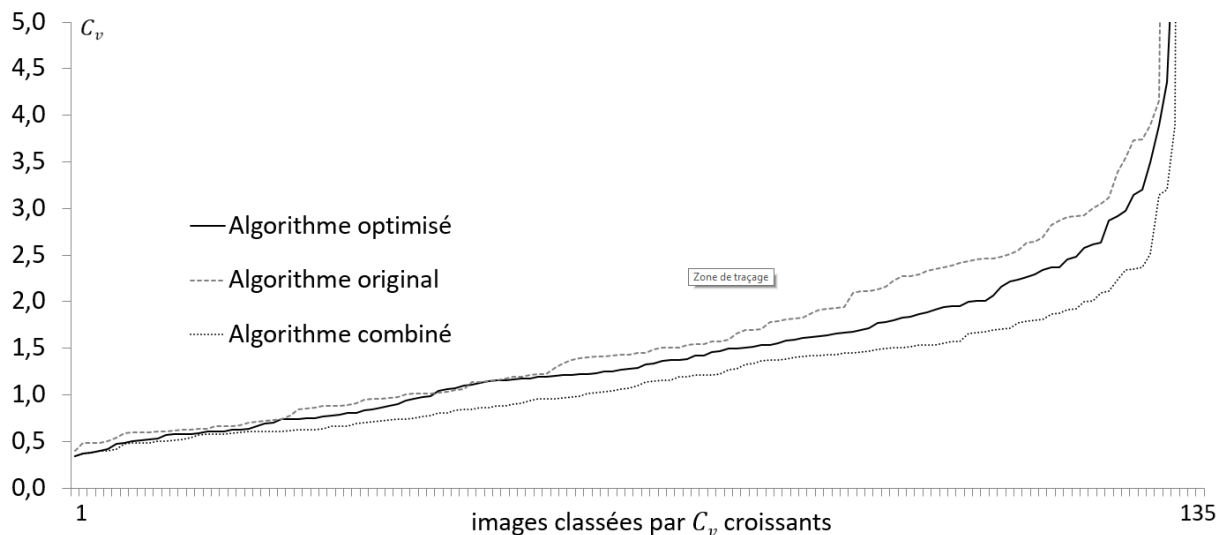


figure 63: Coefficients de variation obtenus avec la méthode de caractérisation de la grille de Malassez.

En résumé, l'optimisation de la méthode permet de passer de 70 à 80% de très bonne caractérisation de la grille de comptage. La combinaison des résultats avec et sans optimisation permet d'obtenir 90% de très bonne caractérisation. L'algorithme est également en mesure de

déterminer que pour 1% des images (2/135), le résultat obtenu pour le positionnement de la grille est aberrant. Ces résultats peuvent donc être mis de côté pour une éventuelle analyse manuelle. Le tableau suivant (tableau 8) présente la répartition des résultats

tableau 8: synthèse de la répartition des coefficients de variation

C_v	Original (%)	Optimisé (%)	Combiné (%)
$C_v < 1$	30	30	46
$1 < C_v < 2$	40	50	44
$2 > C_v < 5$	28	19	9
$C_v > 5$	2	1	1

Focus sur la déviation du ratio de la grille

Un point particulièrement intéressant est apparu en étudiant la répartition des ratios des ROI mesurées (figure 64). On observe que la distribution des ratios de ROI semble former une distribution centrée sur la valeur 0,803. La moyenne des ratios mesurés est de 0,802, légèrement supérieure au 0,8 attendus.

Cette différence apparaît très faible en valeur absolue. Cependant, un test de conformité de Student (134 degrés de liberté) [62] a été effectué en considérant un ratio de ROI théorique de 0,8. Ce test donne une valeur $t_{obs}=6,12$, $p=5 \cdot 10^{-9}$. En se référant à la table du test, il apparaît donc que l'écart constaté dans la mesure du ratio de la région d'intérêt est très hautement significatif. La question est alors de savoir s'il existe un biais dans la méthode de caractérisation de la grille ou si cette différence provient d'une réalité physique dans la structure des lames utilisées.

En regardant de plus près, il s'avère que quatre marques de lames de comptage de Malassez ont été utilisées pour notre étude. Chaque fabricant met en œuvre son propre procédé de fabrication et celui-ci implique une tolérance dans le positionnement des sillons. Nous avons mesuré les ROI pour chaque fabricant, ce qui est représenté dans le graphique suivant (figure 65) dans lequel il apparaît clairement que le ratio de la ROI est caractéristique de la marque de la lame de comptage utilisée. En d'autres termes, la méthode de caractérisation est suffisamment précise pour identifier la marque de la lame de comptage de Malassez utilisée pour prendre l'image d'origine.

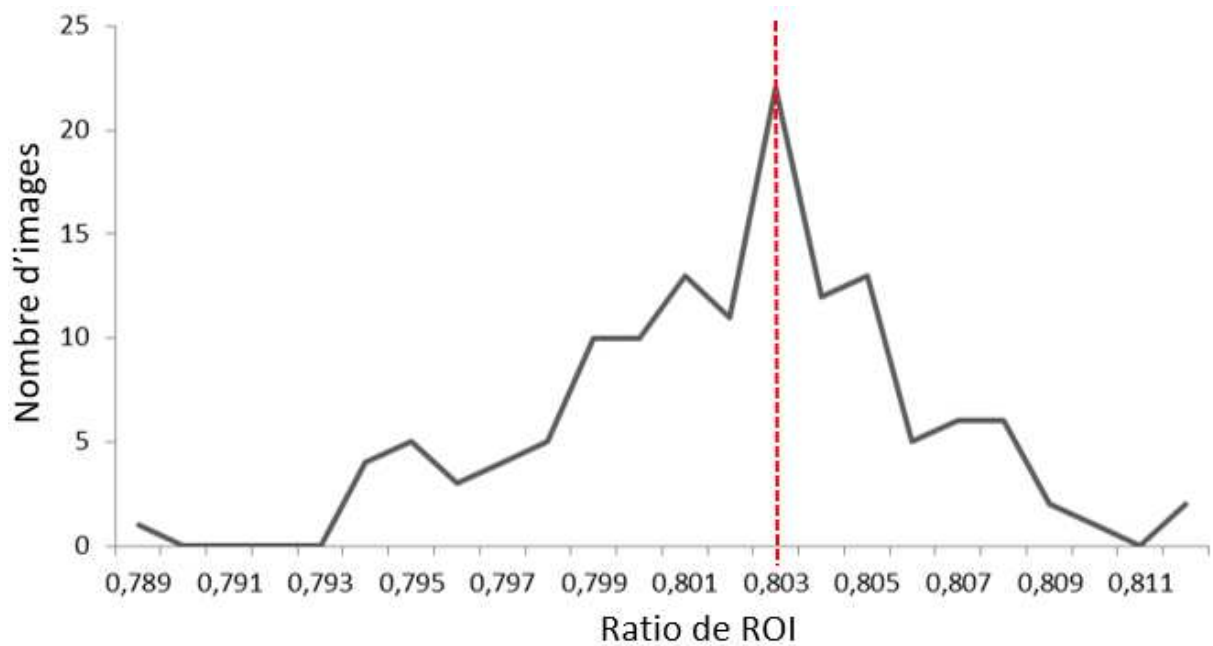


figure 64: répartition des ratio de ROI

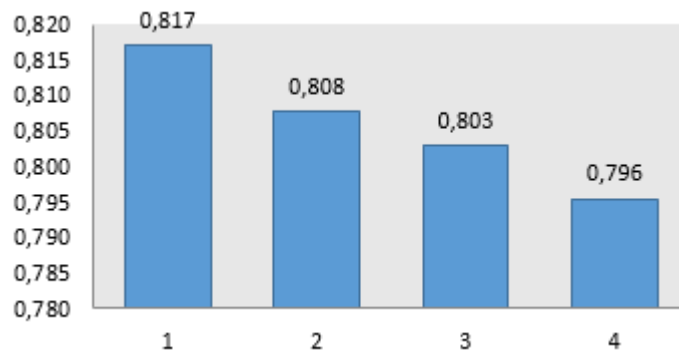


figure 65: ROI mesurée pour quatre fabricants de lames de Malassez (1, 2, 3 et 4)

6. Effacement de la grille

L'effacement de la grille est un élément facilitateur pour la prochaine étape qui est de compter les cellules présentes dans l'image. La grille est en effet un objet utile mais particulièrement « encombrant » lorsqu'il s'agit de détecter les autres objets présents dans l'image, en l'occurrence, les cellules. Afin de supprimer la grille, nous allons filtrer la FFT de l'image. Afin de bien visualiser le fonctionnement de ce filtrage, nous allons commencer par présenter un exemple simplifié en 1 dimension dans lequel nous allons séparer un signal périodique (simulant la « grille ») d'un signal aléatoire (simulant les cellules).

a. Séparation d'un signal aléatoire et d'un signal périodique en 1 dimension :

Pour cette expérience, une courbe représentant schématiquement la coupe d'une grille de comptage est fabriquée (figure 66). Un signal aléatoire (figure 67) est généré puis ajouté à cette courbe (figure 68) pour obtenir une courbe que nous appellerons signal composite.

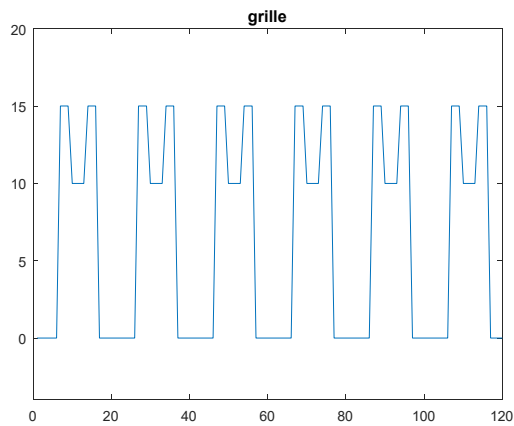


figure 66: courbe schématique représentant la vue en coupe d'une grille de comptage

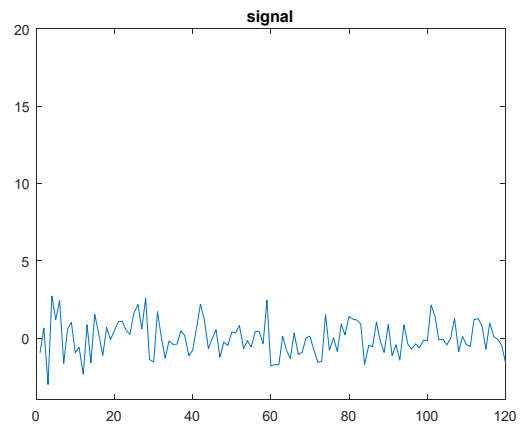


figure 67: signal aléatoire

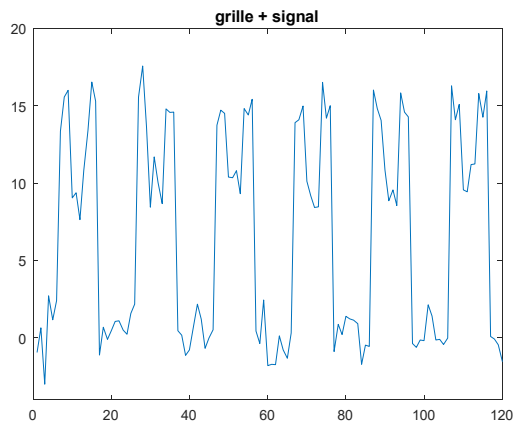


figure 68: signal aléatoire ajouté à la courbe représentant la coupe de la grille

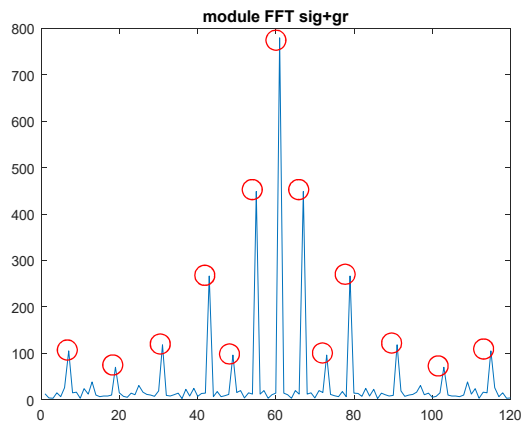


figure 69: pics caractéristiques du signal périodique

La séparation de la « grille » et du signal repose sur la nature périodique de la courbe représentant la grille. Cette périodicité permet d'identifier une série de pics dans les modules de la transformée de Fourier, ce qui constitue une signature (figure 69) :

Nous allons donc séparer la FFT en deux FFT :

- FFT « grille » dont toutes les valeurs sont nulles sauf les valeurs correspondant aux pics qui sont égales aux valeurs de la FFT du signal composite.
- FFT « signal » qui est égale à la FFT du signal composite, sauf pour les pics qui sont annulés.

La grille et le signal sont alors reconstruit en utilisant la transformée de Fourier inverse pour chacune de ces deux FFT reconstituées. Les graphiques suivant montrent la grille reconstruite (figure 70) et le signal reconstruit sans la grille (figure 71) :

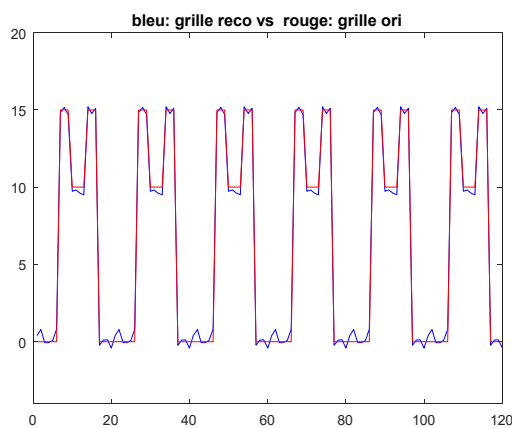


figure 70: reconstruction du signal périodique après filtrage

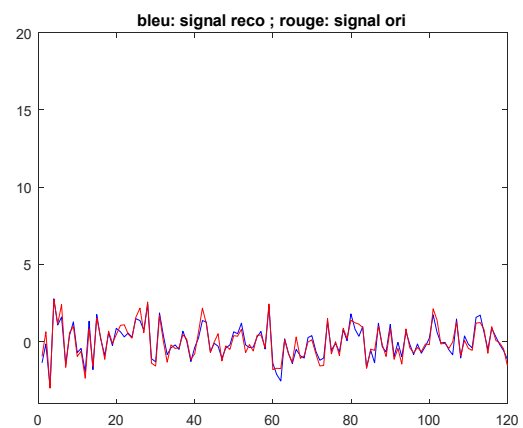


figure 71: reconstruction du signal aléatoire après filtrage

L'erreur quadratique moyenne E est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$E = \frac{1}{L} \sqrt{\sum_{i=1}^L (S(i) - S'(i))^2}$$

Où S et S' sont un signal et son signal reconstruit, L est la longueur de ce signal.

L'expérience de reconstruction du signal représentant la coupe de la grille a été conduite à plusieurs reprises avec des signaux aléatoires différents.

Note : pour cette application, avec un signal périodique et un signal aléatoire uniquement, les erreurs de reconstruction du signal périodique et aléatoire sont égales.

Les erreurs quadratiques obtenues varient entre 0.029 et 0.053. L'erreur pour le résultat présenté dans la figure 71 est 0.035.

Comment expliquer cette erreur ?

Le signal périodique correspondant à la grille est facilement identifiable puisque le module de sa FFT est nul en tout point sauf pour les fréquences du signal. La FFT du signal aléatoire s'étale par contre sur l'ensemble du spectre (figure 72). Lors de la séparation des pics, une partie du signal aléatoire sera mixé avec le signal périodique.

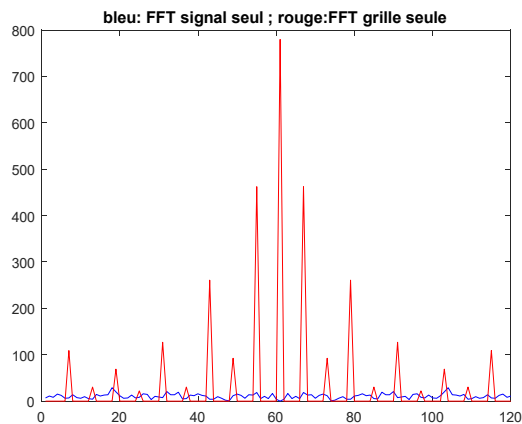


figure 72: FFT du signal périodique (rouge) et du signal aléatoire (bleu)

b. Effacement de la grille dans l'image :

L'analyse par Fourier permet d'intervenir dans l'espace fréquentiel pour isoler un signal périodique. Nous avons vu précédemment comment sélectionner la signature de la grille de comptage dans l'image des modules de la transformée de Fourier 2D. Le but de cette partie est de procéder à l'effacement de la grille de comptage en conservant le signal, c'est-à-dire, en conservant intactes les cellules présentes dans l'image.

i. Soustraction de la grille dans l'espace image :

Nous avons vu dans la partie sur la caractérisation de la grille comment extraire une image de la grille à partir de sa signature dans la FFT (figure 73, figure 74). La première idée est donc de soustraire cette grille directement à l'image d'origine (figure 75).

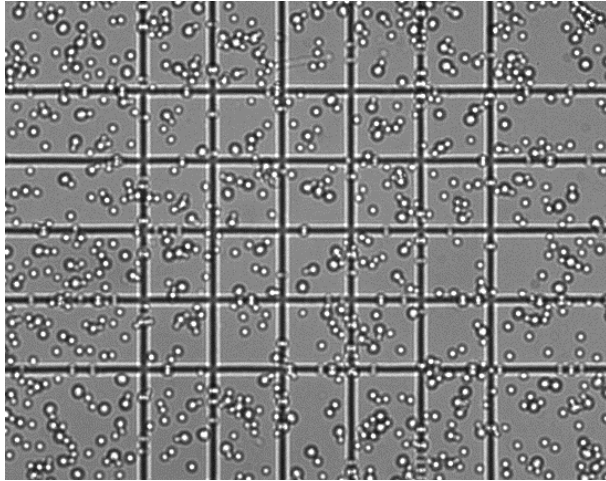


figure 73: image d'origine

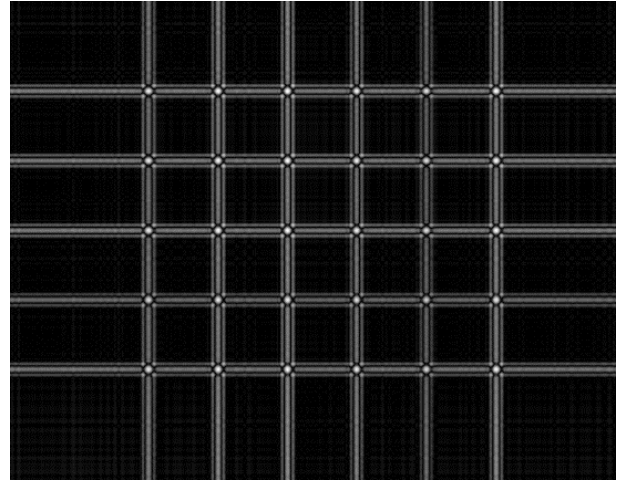


figure 74: grille extraite

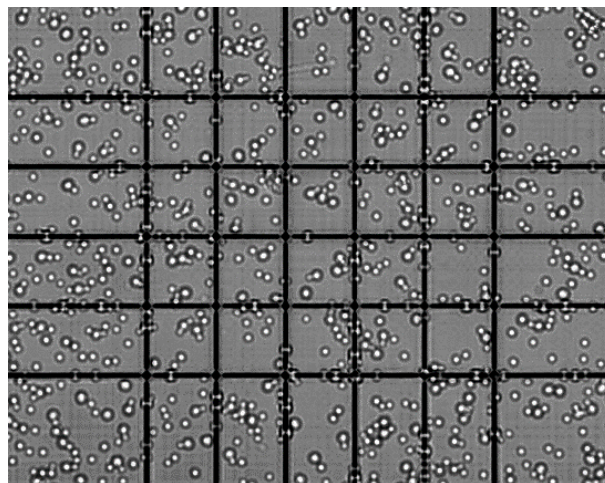


figure 75: grille soustraite à l'image d'origine

Avec cette méthode, la grille devient un objet « noir » dans l'image, ce qui facilite la détection des cellules lorsque celles-ci sont des objets blancs. Il s'agit alors d'effectuer un seuillage pour les séparer du reste de l'image. Néanmoins, dans certaines des images, les cellules apparaissent comme des objets sombres. Dans ces cas, cette méthode « d'effacement » de la grille peut devenir un facteur d'erreur pour la détection des cellules. Pour pallier cet inconvénient, travailler sur un filtrage dans la transformée de Fourier semble donc plus judicieux.

ii. Annulation de la signature de la grille dans la FFT

Pour illustrer l'annulation de la signature de la grille dans la FFT, nous allons utiliser les deux images suivantes (figure 76 a, b). Pour chacune de ces deux images, nous pouvons isoler la signature de la grille dans la FFT puis l'annuler pour obtenir le signal restant (figure 77 a, b). Dans le résultat obtenu, il n'apparaît plus que les cellules, les intersections de la grille et

quelques « traces » de la grille liées au chevauchement des fréquences propres à la grille et des fréquences aléatoires liées au reste de l'image. Néanmoins, avec cette méthode, on peut observer une dégradation des cellules. Ceci est dû au fait que le pic principal de la FFT est associé au signal de la grille. Hors, ce pic seul représente la moyenne de l'image. Dans ce résultat, la moyenne est donc retirée, ce qui abime certaines cellules. Il est possible d'améliorer ces résultats en conservant le pic d'intensité principal (figure 78 a, b). Dans ce résultat, l'image dans sa globalité est assombrie. Néanmoins, on peut observer que les cellules présentes sur les barreaux de la grille sont moins affectées par cet assombrissement. La grille en elle-même est très fortement atténuée pour l'image dans laquelle elle est le plus contrastée à l'origine. Elle, en revanche, est complètement effacée dans l'image où elle est le moins contrastée. Il reste néanmoins une légère empreinte de la grille dans le fond de l'image résultante.

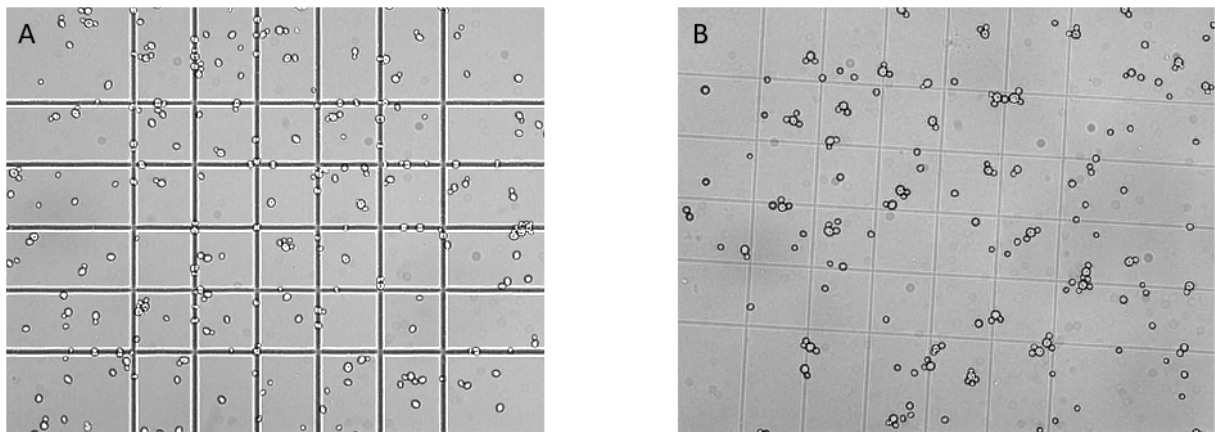


figure 76: images d'origines (A, B)

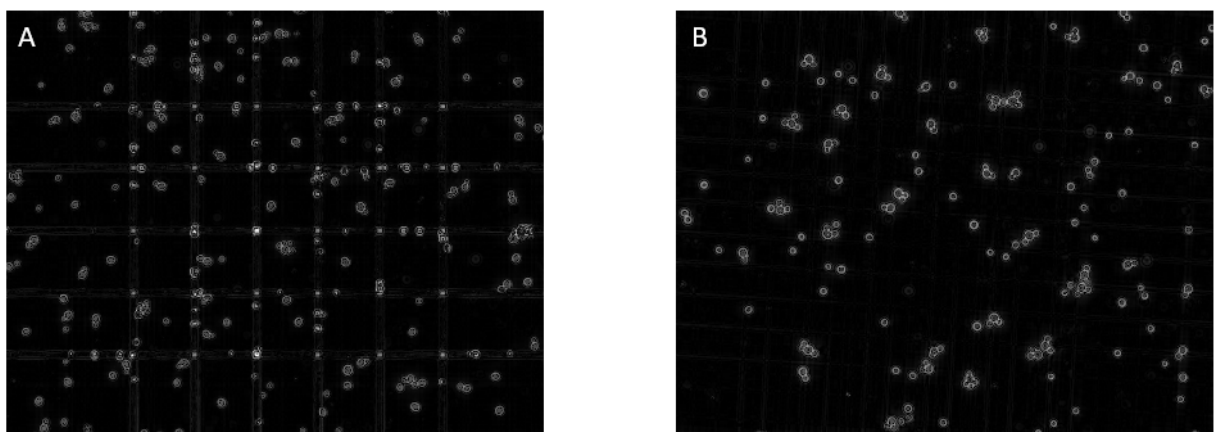


figure 77: signal seul, respectivement pour les images A et B

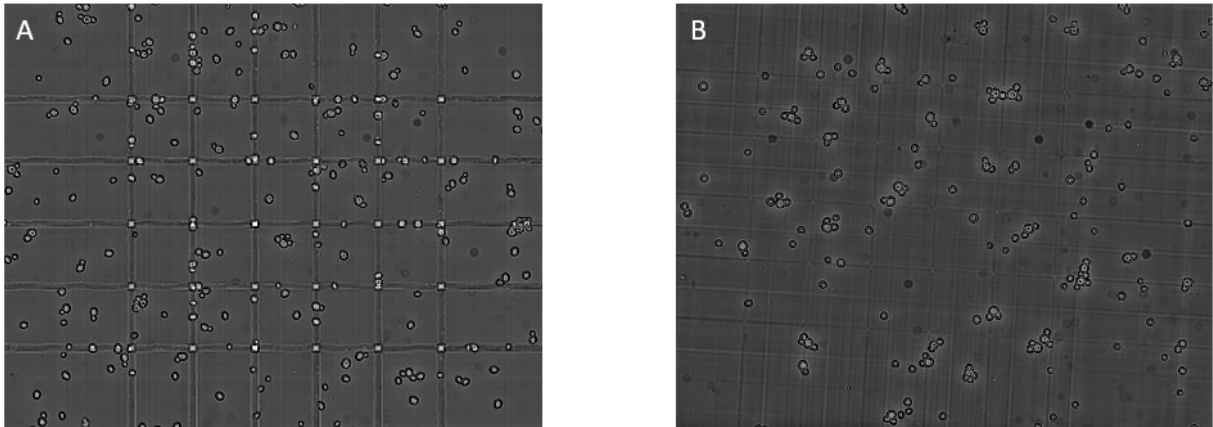


figure 78: signal reconstruit en ajoutant le pic central de la FFT (moyenne) pour les images A et B

Origine et l’empreinte de grille résiduelle et solution pour l’atténuer

Afin d’observer précisément l’impact de l’annulation de la signature de la grille dans la FFT, nous avons utilisé une image synthétique très simple, composée de trois disques blancs sur fond noir, simulant très grossièrement des cellules isolées (figure 79 A). Dans la FFT de cette image, nous avons supprimé la signature d’une grille imaginaire (figure 79 B, C) puis effectué la FFT inverse (figure 79 D).

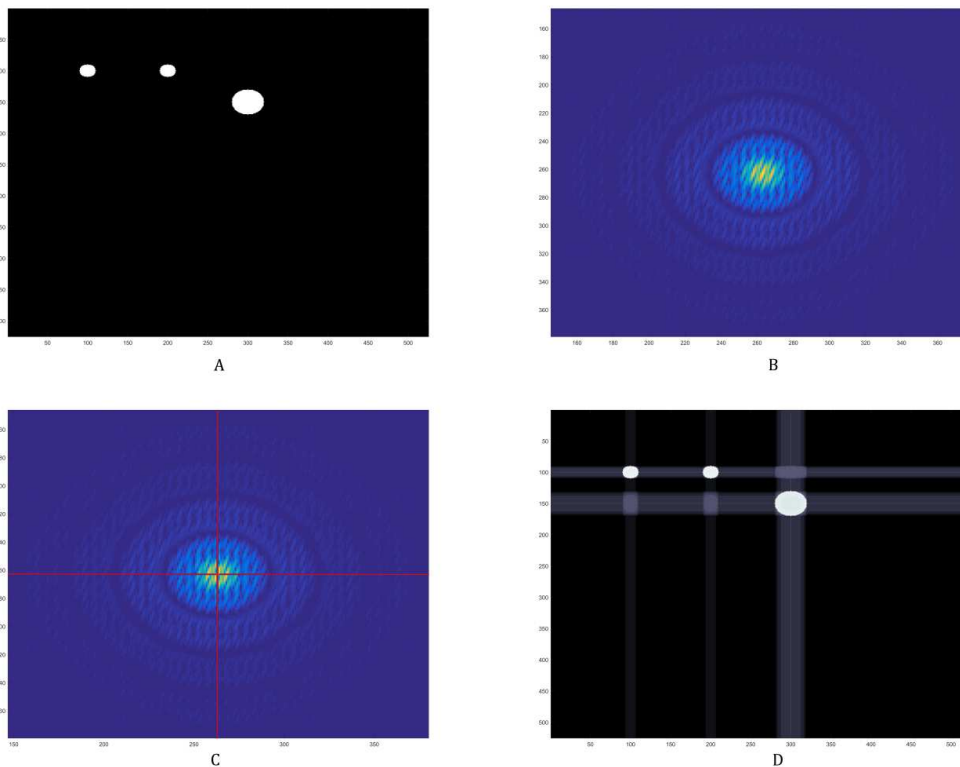


figure 79: images schématique de cellules seules (A), FFT de l'image d'origine (B), filtrage de la FFT suivant un motif de croix centrée (C), reconstruction de l'image après filtrage (D)

L'annulation des deux lignes, verticale et horizontale, dans la FFT crée deux traces, horizontale et verticale, dans l'image. Dans cet exemple, il apparaît clairement que les traces résiduelles ne sont pas liées à la présence de la grille mais à la suppression d'une partie du signal généré dans la FFT par les cellules.

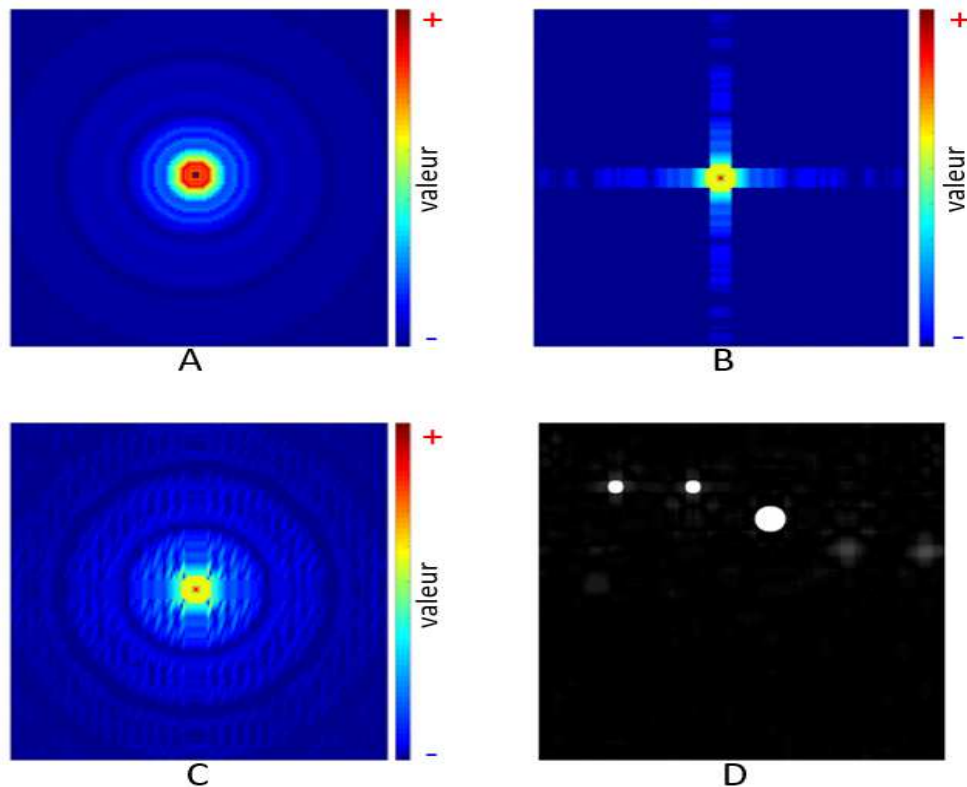


figure 80: moyennes iso fréquentielles dans la FFT (A), moyennes iso fréquentielles le long du filtre cruciforme (B), substitution par les moyennes le dans la FFT d'origine (c), image reconstruite (D)

Nous proposons donc, plutôt que d'annuler la signature de la grille dans la FFT, de la remplacer par des valeurs qui pourraient représenter le signal lui-même. En considérant la FFT centrée en deux dimensions, un cercle de rayon R centré sur le centre de la FFT peut être vu comme une courbe iso fréquentielle. La figure 80 (A) représente ces courbes iso fréquentielles. L'idée est que le signal aléatoire ne possède pas d'orientation particulière, contrairement à la grille, et donc, qu'il représente des fréquences similaires dans toutes les directions. Nous allons donc remplacer la signature de la grille par les moyennes iso fréquentielles. Les figure 80 B et C représentent la sélection des iso fréquences et leur remplacement dans la FFT de l'image originale. La figure 80 D montre le résultat obtenu, l'image d'origine (signal) est légèrement dégradée : le contraste de l'image a été augmenté après coup pour mettre en évidence l'apparition de quelques artefacts toutefois assez faibles pour ne pas perturber un traitement ultérieur.

Remplacement de la signature de la grille par les moyennes isofréquentielles

Nous avons vu précédemment que l'annulation du signal de la grille est un processus qui agit également sur le signal aléatoire (les cellules seules) que nous cherchons à isoler. Nous remplaçons donc chaque point de la signature de la grille par la valeur moyenne du cercle isofréquentiel passant par ce point. Le résultat obtenu dans le cas d'une grille très contrastée est présenté dans la figure 81. Dans cette image, la grille n'est pas parfaitement effacée mais elle est très atténuée. Elle laisse une légère empreinte qui n'est pas gênante pour de futurs traitements. Les intersections de barreaux restent très visibles et apparaissent comme des carrés blancs. Pour les traitements ultérieurs, afin d'éviter que ces artefacts génèrent des erreurs, nous nous reposerons sur la caractérisation de la grille pour déterminer des zones d'exclusion. Dans le cas d'une grille moins contrastée (figure 82), le résultat est un effacement quasi parfait. Dans tous les cas, la substitution de la signature par les moyennes isofréquentielles permet d'obtenir une image résultante ayant une luminosité similaire à l'image d'origine.

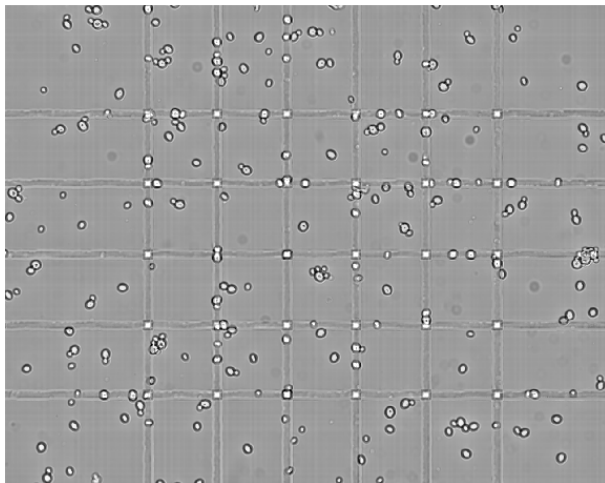


figure 81: Effacement de la grille très contrastée (image A)

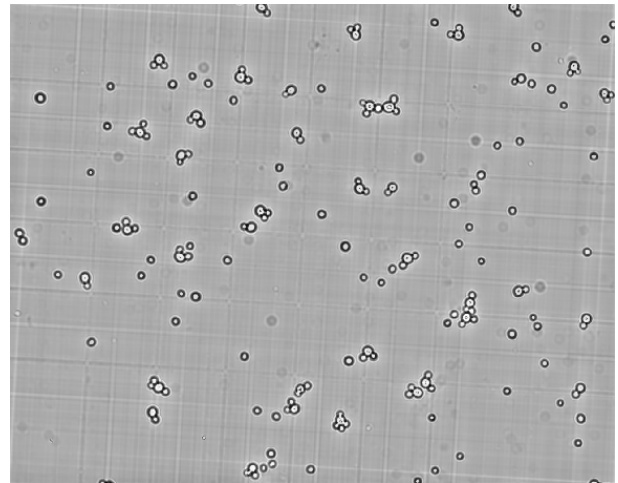


figure 82: Effacement de la grille très contrastée (image B)

La figure 83 illustre un groupe de cellules positionnées sur un barreau de grille avant et après le processus d'effacement. L'impact du processus d'effacement sur les cellules est très limité, voire nul, ce qui est l'objectif recherché pour les traitements ultérieurs qui concernent l'isolation et le comptage de ces cellules.



figure 83: Zoom sur un groupe de cellule positionné sur un barreau, avant (gauche) et après (droite) le processus d'effacement de la grille

7. Conclusion

Dans cette partie, nous avons cherché à répondre à trois objectifs :

- **La caractérisation de la grille de comptage dans les images**

Elle est effectuée en se reposant sur sa nature fréquentielle et en utilisant le filtrage dans la FFT. La méthode que nous proposons permet une excellente précision, suffisante pour déterminer le fabricant de la lame de comptage. L'auto-évaluation du traitement est réalisée à l'aide des deux paramètres Cv et ROI. L'extraction d'une ROI correcte permettra ultérieurement de déterminer une concentration cellulaire à partir du comptage des individus.

- **La préparation de l'image pour le comptage cellulaire (prétraitement)**

Elle est obtenue en effaçant la grille tout en conservant intactes les cellules dans l'image. Cette méthode est basée sur la substitution de la signature de la grille dans la FFT par les moyennes iso-fréquentielles.

- **L'absence d'intervention humaine pour le traitement des images**

La méthode proposée pour la caractérisation et l'effacement de la grille a pour avantage de ne nécessiter aucun réglage manuel. Cet avantage est obtenu grâce à la recherche de la signature de la grille dans l'espace de Fourier : dans cet espace, cette signature présente une largeur constante d'un pixel quel que soit l'image.

La figure suivante (figure 84) présente un résumé de la méthode proposée :

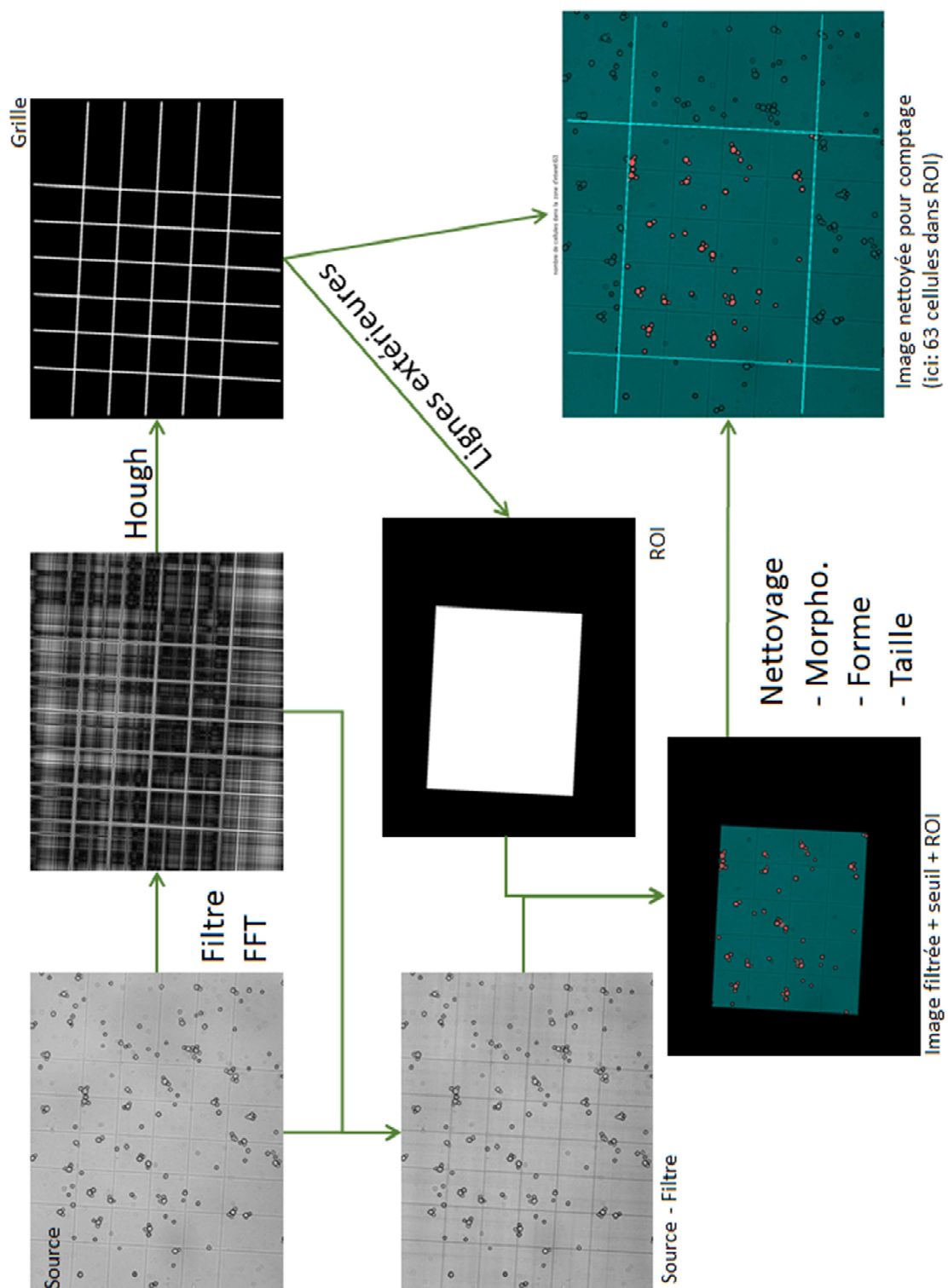


figure 84: récapitulatif de la méthode de détection et de caractérisation de la grille

Chapitre 3 : Comptage cellulaire

1. Introduction

Le comptage manuel des cellules en utilisant des lames de Malassez impose le respect d'un protocole et de règles strictes. Dans le but d'éviter tout oubli, le protocole impose généralement de parcourir visuellement le quadrillage de la grille dans un ordre précis (figure 85).

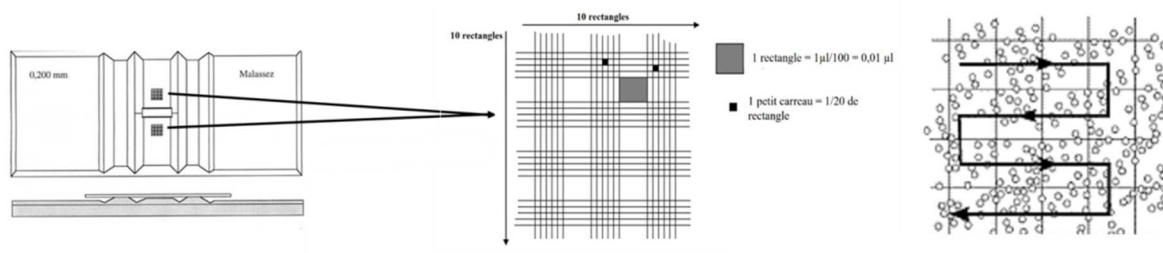


figure 85: de gauche à droite, la lame de Malassez, zoom sur la zone de comptage, parcours visuel habituel pour le comptage

Les règles permettent de traiter les cas litigieux concernant les cellules chevauchant le bord de la grille : il s'agit là de déterminer si elles sont « dedans » ou « dehors » ? Il existe deux principales règles pour trancher ces cas : on peut décider qu'une cellule chevauchant un bord est « dedans » si moins de 50% de sa surface est extérieure à la grille. On peut également utiliser une approche statistique, plus simple à mettre en œuvre, en décidant que les cellules qui chevauchent deux des bords de la grille sont à l'intérieur et qu'elles sont à l'extérieur si elles chevauchent les deux autres bords ; on estime alors que statistiquement, les cas litigieux s'équilibrent entre les cellules incluses et exclues.

Malgré ces protocoles et règles, le comptage manuel pose de nombreux problèmes :

- **Reproductibilité** : Un problème majeur du comptage manuel est qu'il repose sur une observation attentive des images et il est difficile d'en assurer la constance et la reproductibilité, en particulier avec la fatigue ou la lassitude de l'expert en charge du comptage lorsque le nombre d'images augmente. Les résultats de comptages peuvent varier en fonction des règles de comptage appliquées par l'expert et de son état de forme.
- **Subjectivité** : Chaque expert est influencé par ses connaissances *a priori*, dans le cadre du comptage cellulaire. Par exemple, l'expert est en charge de déterminer s'il faut

compter ou pas une cellule bourgeonnante, autrement dit, à partir de quel moment on arrête de parler de bourgeon pour parler d'une nouvelle cellule, problème pour lequel il est très difficile d'avoir un critère totalement objectif à partir d'images de lames de comptage.

- **Coût** : Le comptage manuel implique mobilise un ou plusieurs experts pour environ 1 à 5 minutes par image en fonction de la densité de cellules présentes (complexité). Ce coût en ressources humaines peut être traduit directement en coût financier. Il s'agit là d'un problème important car dans le cas d'expérience à grande échelle, ce coût financier peut devenir prohibitif.

Afin d'apporter des réponses à ces problèmes, nous proposons de développer des méthodes de comptage de cellules automatisées. La première étape est de détecter les cellules, de manière la plus précise possible. Nous nous basons sur une observation simple : les cellules sont des objets circulaires ou pseudo-circulaires qui suggèrent l'utilisation de la transformée de Hough circulaire [63]. Nous allons donc présenter cet outil. Nous présentons également une de ses évolutions, la transformée de Hough circulaire par gradients pour laquelle nous proposons deux innovations, sous la forme de deux nouvelles structures ; les Listes Locales de Contributions et la Matrice des Contributeurs Utilisés dont nous nous servons pour enrichir la méthode et améliorer la précision des résultats. Pour conclure ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus pour la détection et le comptage cellulaire.

2. Concepts généraux

a. Transformée de Hough Circulaire

Nous avons vu dans le chapitre précédent la transformée de Hough linéaire. La transformée de Hough circulaire repose sur les deux mêmes principes :

- La dualité entre une courbe définie par une équation cartésienne et l'espace des paramètres.
- Le principe d'accumulation dans l'espace des paramètres.

Dans le cas de la transformée linéaire, l'équation cartésienne est donnée par :

$$\rho - y * \cos(\theta) + x * \sin(\theta) = 0$$

La dualité est mise en évidence en fixant soit les paramètres (ρ, θ) , soit les coordonnées (x, y) . L'équation précédente définit alors soit une droite dans l'espace image, soit une sinusoïde dans l'espace des paramètres.

Le cas linéaire est le plus simple car l'espace image et son dual sont tous deux de même dimension.

L'adaptation de la transformée de Hough à la détection de cercles est proposée en 1975 par Ballard [64]. Le point de départ de la transformée de Hough Circulaire est l'équation cartésienne du cercle :

$$(x - a)^2 + (y - b)^2 = r^2$$

Cette équation décrit l'ensemble des points (x, y) du cercle de centre (a, b) et de rayon r . Les dimensions de l'espace image (x, y) et de son dual (a, b, r) sont alors différentes, ce qui pose problème pour la recherche de pics d'accumulation dans l'espace dual. En effet, si, à l'instar de la transformée de Hough linéaire, on fixe x et y , l'équation ci-dessus est celle d'un cône. La solution proposée consiste en la fixation de r à différentes valeurs dans un intervalle. Autrement dit, la transformée de Hough circulaire impose un « à priori » sur la taille des cercles recherchés.

Avec r fixé, il apparaît une « symétrie » entre l'espace image et l'espace des paramètres : En effet, fixer (a, b) détermine un cercle de rayon r dans l'espace image et fixer (x, y) détermine un cercle de rayon r dans l'espace des paramètres.

Dans la transformée de Hough circulaire, il ne s'agit donc plus d'associer un espace de paramètres à l'espace image mais un espace pour chaque r de l'intervalle de recherche que nous pourrions appeler $TH(r)$.

De même que pour la transformée de Hough linéaire, l'accumulation des intersections dans $TH(r)$ permet d'identifier le centre (a, b) d'un cercle de rayon r (figure 86).

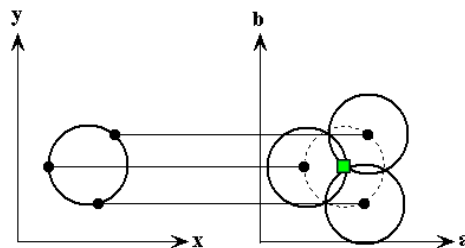


figure 86: exemple de transformée de Hough circulaire, chaque point dans l'espace image donne naissance à un cercle dans l'espace des paramètres

Dans le cas idéal, avec une variation continue de r , on peut représenter la recherche de cercles dans un espace de Hough à trois dimensions par le lieu d'intersection des cônes déterminés par chaque point de l'espace image original (figure 87) avec des plans horizontaux.

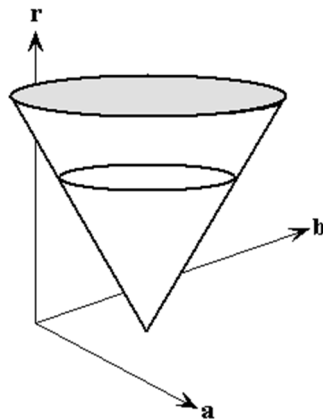


figure 87: cône engendré par un point de l'espace image dans l'espace des paramètres dans le cas d'une transformée de Hough circulaire recherchant des cercles de rayons compris entre 0 et r

Dans la pratique, comme pour la transformée de Hough linéaire, il est nécessaire d'échantillonner l'espace des paramètres. Le « cône de détection » sera défini par l'empilement d'un ensemble d'accumulateurs, un pour chaque valeur de r de l'intervalle de recherche (figure 88) [57].

Dans la transformée de Hough circulaire, l'augmentation de l'intervalle de recherche des rayons de cercles implique une forte consommation de ressources (calcul, mémoire). Dans le cas concret, on observe également que l'augmentation de l'intervalle de recherche nuit à la sensibilité de la méthode et peut engendrer des faux positifs ou des faux négatifs (figure 89).

Pour obtenir une détection correcte, il est donc nécessaire d'avoir une connaissance *a priori* de l'image étudiée (taille en pixels des rayons des cercles recherchés).

Cette limite est très importante car elle n'autorise pas une recherche « aveugle », c'est-à-dire, une recherche sans autre supposition que la présence de cercle dans l'image. L'usage de la transformée de Hough circulaire dans sa version originale impose également d'avoir un *a priori* sur la taille des cercles supposés apparaître dans l'image pour écarter le risque de détections aberrantes et conserver un temps de traitement et un usage de mémoire acceptables.

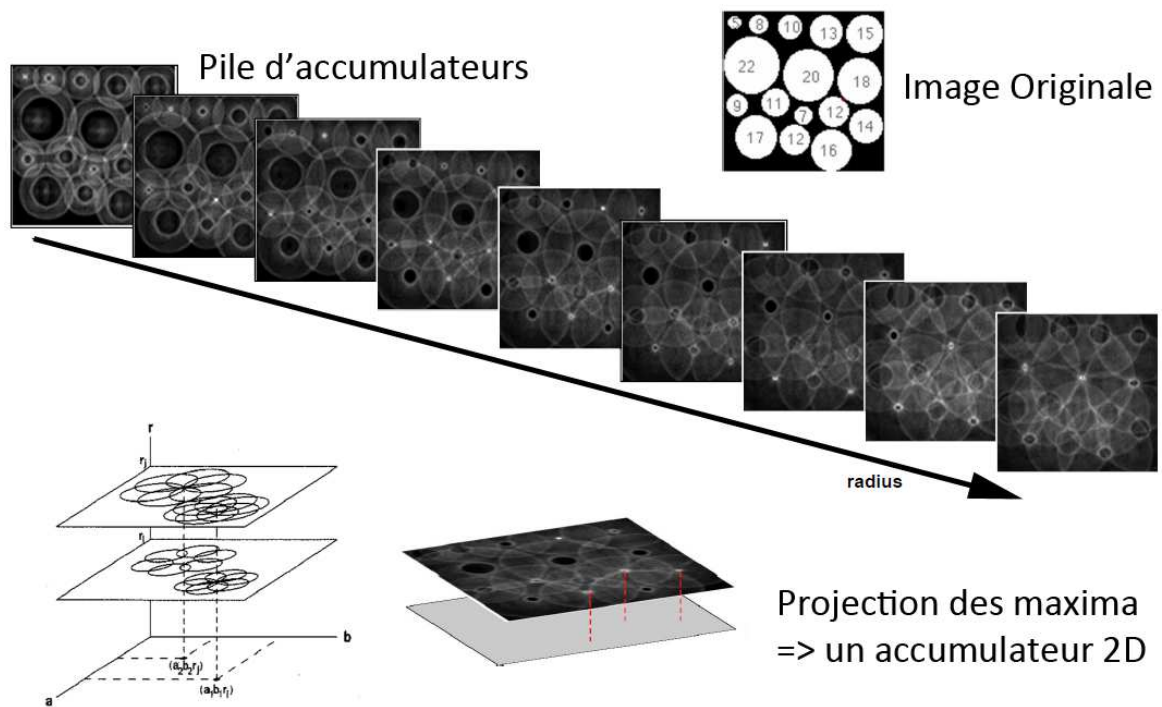


figure 88: pile d'accumulateurs engendrés pour chaque rayon de recherche

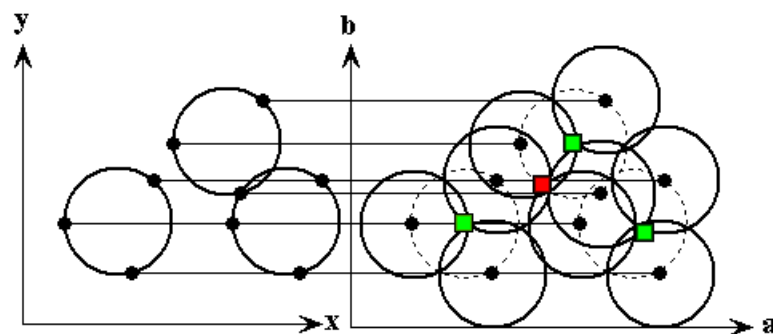


figure 89: illustration du risque de faux positifs dans la transformée de Hough circulaire, une accumulation parasite se crée (point rouge) du fait de la densité de cercles à détecter

b. La transformée de Hough par gradient

Les limites de la transformée de Hough circulaire ont amené le développement d'une nouvelle méthode de détection de cercle proposée par Davies [65] basée sur deux remarques :

- 1) Les rayons d'un cercle s'intersectent en son centre
- 2) Les rayons d'un cercle sont normaux à son périmètre

En se basant sur ces deux remarques, Davies propose une méthode reposant sur l'information de gradient.

Dans la transformation de Hough par gradient, l'espace image d'origine est enrichi avec l'information du gradient, ce qui permet d'aboutir à un espace dual de paramètre de seulement deux dimensions. Dès lors, le problème de recherche de pics dans l'accumulateur devient identique au problème posé dans la transformée de Hough linéaire.

L'idée générale est que la direction des gradients dans l'image est normale aux contours. Dans le cas d'un cercle ou d'un disque (figure 90), en faisant l'hypothèse d'une erreur négligeable dans leur calcul, les gradients suivront donc la direction des rayons et s'intercepteront en son centre.

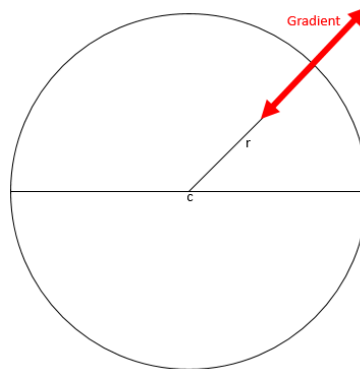


figure 90: convergence des gradients au centre du cercle

Dans la pratique, la convergence au centre « exact » des cercles manque de précision pour deux raisons principales :

- La discrétisation de l'image : les cercles visibles sont en fait une construction de notre esprit car en réalité, ils ne sont composés que d'un ensemble de pixels. Un cercle au sens « image » est donc très éloigné d'un cercle au sens mathématique. De ce fait, les normales au cercle et les gradients sont calculés en chaque pixel du cercle en fonction d'un voisinage plus ou moins étendu et ne sont que des approximations du résultat qui serait obtenu avec le cercle mathématique correspondant.
- L'irrégularité de l'image : dans un exemple construit sur mesure tel que celui montré dans la figure 90, le cercle est parfait. Dans la pratique, avec des images réelles, les cercles peuvent présenter de nombreuses irrégularités : la forme de l'objet observé peut ne pas être parfaite, l'angle de caméra ou les aberrations de l'objectif peuvent déformer la scène, la complexité de la scène peut créer des artefacts ou des masquages...

Dans le cas d'une image réelle, ces facteurs inévitables d'altération de la qualité du gradient calculé conduisent à l'étalement du lieu de convergence autour du centre du cercle (figure 91).

Il est évident que plus l'imprécision dans l'approximation du gradient sera importante, plus la zone de convergence sera étalée, à terme, la détection du cercle peut devenir impossible. Le fonctionnement correct de la transformée de Hough par gradient repose donc sur des méthodes efficaces d'approximation du gradient.

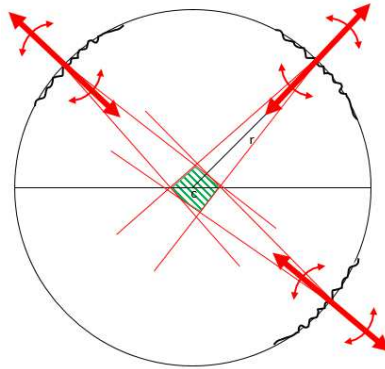


figure 91: imprécision de convergence dans le cas d'une image réelle

3. La détection et le comptage des cellules

a. Pourquoi choisir la transformée de Hough par gradient ?

Les cellules à compter dans les 137 images de l'expérience présentent des particularités en termes de détection de forme circulaire.

- Les cellules sont des formes circulaires ou quasi-circulaires d'environ dix à quinze pixels de rayon.
- La forme des cellules est impactée par la présence de flous de différentes origines:
 - La diffraction de la lumière (glycérol)
 - Un réglage approximatif de la mise au point par l'opérateur
 - La faible profondeur de champ du microscope associé à une sédimentation parfois incomplète des cellules.
- On observe des amas, dans lesquels les cellules se rapprochent, ce qui les déforme dans des proportions suffisantes pour les qualifier de pseudo circulaires (figure 92).

Nous observons donc que les levures sont de tailles variables et qu'elles présentent des formes pseudo-circulaires ainsi que des contours parfois flous.

Nous avons également dû faire face aux difficultés liées au traitement d'image en général que nous avons présenté dans le premier chapitre (page 60). Nous travaillons donc avec les images traitées pour éliminer le bruit de fond et uniformiser la luminosité.

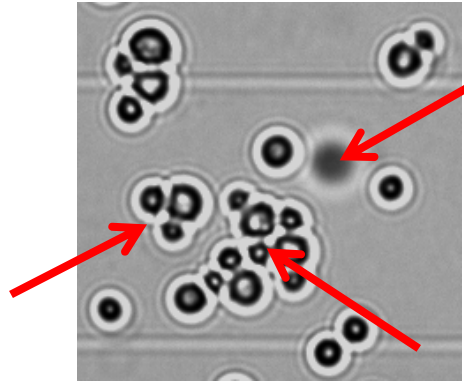


figure 92 Cellules de levures formant un amas et déformation du périmètre de certaines cellules (flèches rouges). Le flou est dû à la présence de glycérol.

La présence de glycérol, nécessaire pour notre expérience, influe fortement sur la diffraction de la lumière et crée un flou ainsi que du bruit dans les images. Cela génère une difficulté vis-à-vis de la détection précise des points de contour, essentielle pour obtenir une transformée de Hough circulaire (CHT) correcte (figure 92), le résultat des algorithmes de détections de contours de type Canny ou Sobel [58], [66], prérequis pour la mise en œuvre d'une CHT étant fortement impacté.

En revanche, comme nous allons le préciser dans le paragraphe suivant, la transformée de Hough par gradients (GAT, pour « Gradient Accumulation Transform »), qui ne repose pas sur la détection des contours, peut tirer parti de ce flou ou à minima, ne pas être pénalisée par sa présence. L'espace des paramètres de la GAT est également plus compact et offre la possibilité de faire des recherches sur des plages de rayon plus étendues.

Compte tenu des limites de la transformée de Hough circulaire, l'emploi de la transformée de Hough par gradient (GAT) semble donc plus adapté.

b. Calcul du champ de gradients dans l'image

Une question importante est de déterminer ce qu'est un champ de gradient correct. L'espace image est, par nature, un espace discrétisé. Le calcul de gradients peut reposer sur la détection de contours précis en utilisant des filtres classiques qui donnent un ensemble de ligne discrétisées. L'estimation de la direction de ces lignes, et donc, des normales à ces lignes (gradients), est un problème complexe mis en évidence dans les travaux de D. Coeurjolly [67].

Ces travaux mettent en évidence la nécessité de prendre en compte le voisinage de chaque point pour obtenir une estimation précise de la direction de la courbe en ce point, et donc, du gradient.

Le flou dans l'image, qui est un problème pour les filtres de détections de contours, est l'une des principales raisons qui nous orientent vers la GAT car pour son calcul, il est essentiel de disposer d'une approximation précise des gradients et nous allons voir que ce flou est alors très intéressant.

Dans nos images, le flou représente de fait une moyenne des gradients voisins, et diminue le biais que pourrait présenter un calcul de gradient sur une ligne, c'est-à-dire sur quelques pixels d'une courbe discrétisée. Le calcul de la GAT tire donc parti du flou dans l'image car il permet de minimiser l'erreur commise dans le calcul des champs de gradient. Pour les images les plus nettes, nous réalisons une convolution de l'image avec la dérivée du premier ordre d'un noyau gaussien. Cette opération génère un flou bénéfique pour le calcul correct des gradients. La figure 93 montre le calcul d'un champ de gradients à partir d'une cellule floue. Nous avons conservé uniquement les vecteurs de gradient ayant un « grand » module au sens de la méthode de seuillage d'Otsu. Cet exemple nous permet de constater visuellement la pertinence du champ de gradients obtenu. Ce champ de gradients s'ajuste correctement aux contours de la cellule et leurs directions convergent vers son centre, comme attendu pour le calcul de la GAT.

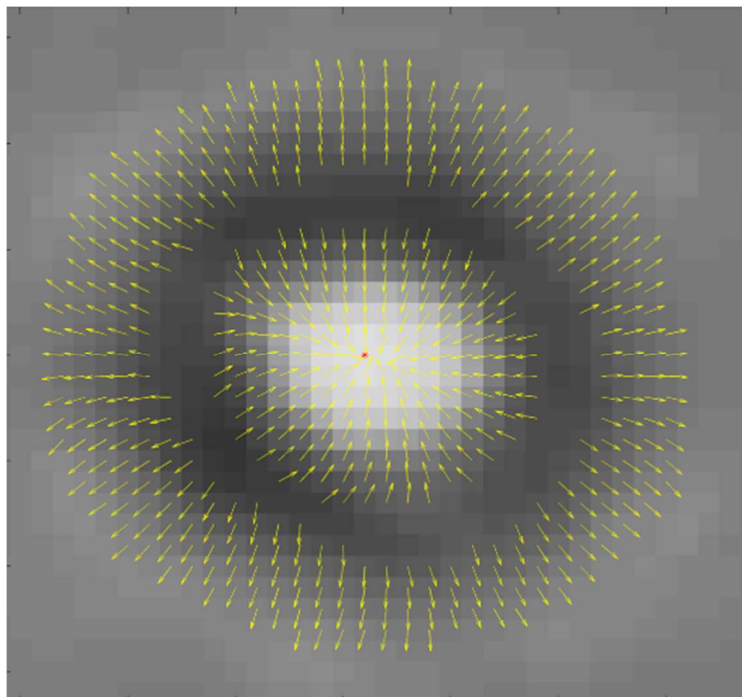


figure 93 Champ de gradient d'une cellule floue. Les flèches jaunes indiquent la direction des gradients, en rouge le point de convergence principal de tous les gradients

c. Calcul de la transformée de Hough par gradient

Le champ de gradients étant correctement calculé, l'étape suivante est de procéder à la construction de la matrice d'accumulation. La méthode de base utilise un incrément unitaire le long des directions données par le champ de gradient mais il est possible d'adopter une stratégie plus subtile, introduite par Atherton et Kerbyson [68], basée sur le concept de résonance (figure 94).

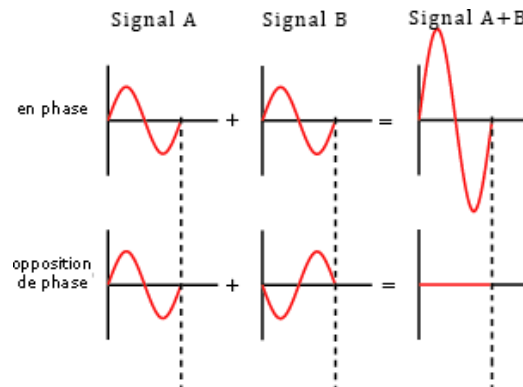


figure 94 Illustration du principe de résonance.

Pour tirer parti du phénomène de résonance, il est intéressant d'utiliser un **incrément complexe** (\mathbb{C}) en codant le rayon du cercle dans la phase d'un complexe de module 1 selon l'équation suivante [69] :

$$\xi_k = e^{2i\pi k/N}$$

Avec N , le rayon maximum recherché et k variant de 0 à $N - 1$.

En utilisant cette incrémentation complexe, les votes dans l'accumulateur sont des nombres complexes dont les phases seront échelonnées entre 0 et $2\pi*(N-1)/N$ le long de la plage de rayon. Le phénomène de résonance se traduit alors par :

Les votes des intersections de segments issus de points n'appartenant pas au même cercle (non équidistant de l'intersection) seront déphasés. Au final, plus la différence de distance de l'intersection des deux segments aux deux points à l'origine de cette intersection est grande, moins l'incrémentation de l'accumulateur sera importante. Au contraire, pour deux points appartenant au même cercle, l'incrémentation de l'accumulateur sera maximum. Ce principe de résonance permet donc de réduire bruit de fond et d'augmenter le contraste de l'accumulateur, en renforçant les pics pertinents tandis que les pics parasites sont diminués. Ce

principe, illustré par la figure 95, est explicité par les équations suivantes dans lesquelles a et b représentent les distances au point d'origine :

$$|e^{ia} + e^{ib}| = \sqrt{2}\sqrt{1 + \cos(a - b)}$$

$$\text{Si } a = b \rightarrow |e^{ia} + e^{ib}| = 2$$

$$\text{Si } a \neq b \rightarrow |e^{ia} + e^{ib}| < 2$$

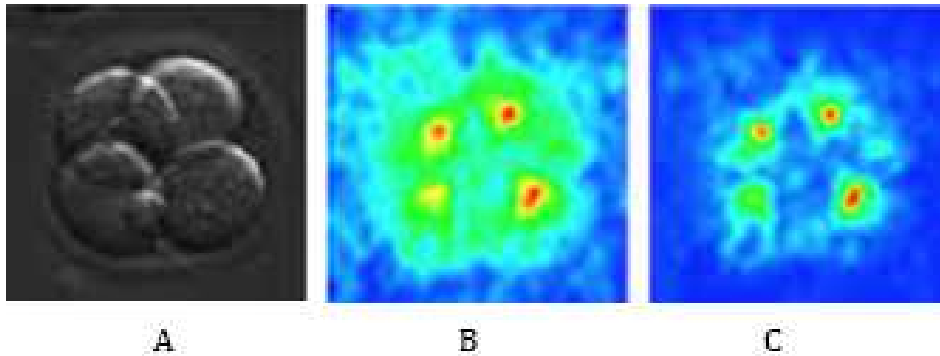


figure 95 Utilisation de vote complexe. A) image originale, B) accumulateur classique, C) accumulateur complexe. L'échelle de couleur représente les valeurs basses en bleu et hautes en rouge. D'après [69]

d. Problématiques liées à la recherche de pics dans l'accumulateur

Le principe de base d'une transformée de Hough, qu'elle soit linéaire, circulaire ou par gradient, est de générer des pics dans la matrice d'accumulation pour chaque objet, puis de rechercher les pics pertinents. La méthode classique pour la recherche des pics est itérative et consiste à rechercher la plus grande valeur, en déduire les paramètres de l'objet correspondant, à retirer cette valeur de la matrice d'accumulation puis à répéter ce processus. Il se pose alors deux questions : la première est relative à la manière de retirer un pic de la matrice d'accumulation. La nature discrète de l'image et les approximations calculatoires obligatoires impliquent qu'un pic de valeur représente en fait une zone de quelques pixels dans la matrice d'accumulation et c'est cette zone dans son ensemble qu'il faudrait éliminer. Comme il s'agit d'un processus itératif, la seconde question est relative à la condition d'arrêt pour laquelle la méthode classique est de déterminer un seuil correspondant à une fraction de la valeur du pic d'intensité maximale et à ne considérer que les pic d'intensité supérieure à ce seuil, ce qui pose des problèmes de faux positifs ainsi que de faux négatifs suivant la répartition des pics pertinents.

Pour retirer chaque pic et son voisinage, la solution classique consiste à déterminer une zone d'exclusion autour de la valeur maximum [65], [70].

Ce type d'approche, qui répond aux deux questions, est intéressante en terme de temps de calcul mais présente néanmoins quelques inconvénients majeurs :

- Le seuil nécessaire pour la condition d'arrêt est fixé empiriquement et doit éventuellement être réadapté pour chaque application. Cet aspect est particulièrement gênant pour notre objectif d'automatisation maximale.
- La taille du voisinage d'exclusion peut conduire à des résultats aberrants (faux positifs, faux négatifs). Qui plus est, il est également nécessaire de déterminer, souvent empiriquement, la bonne taille de voisinage pour une application donnée, ce qui est également problématique compte tenu de nos objectifs.

La figure 96 montre une séquence de détection de deux cercles. Nous utilisons une taille de voisinage d'exclusion très classique de deux pixels (soit un carré 5x5). Lors de la première itération, le problème est immédiatement mis en évidence puisque les valeurs relatives au centre du petit cercle sont effacées de l'accumulateur ; dès lors, il ne sera plus possible de le détecter (faux négatif). Pour les besoins de la démonstration, afin que la méthode se poursuive, nous avons volontairement choisi un seuil très bas pour la condition d'arrêt. La matrice d'accumulation n'étant pas annulée, il est donc possible de procéder à une nouvelle itération, qui, à partir des résidus du pic principal, donne un faux centre. Une troisième itération donne à nouveau un résultat aberrant avant d'arriver au seuil de la condition d'arrêt.

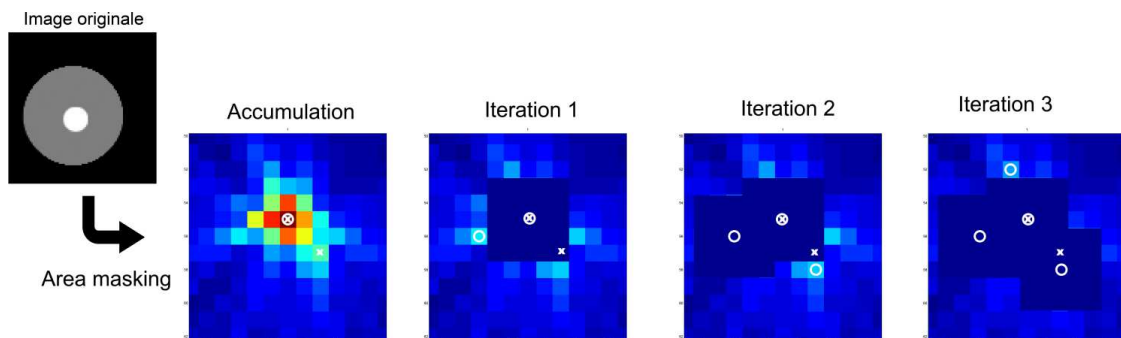


figure 96 Itération successive de la technique d'exclusion de voisinage. Les x blancs sont les centres théoriques à trouver, les o blancs sont les centres effectivement "vus" par la méthode.

e. Listes locales de contributeurs et matrices d'usages des contributions : la déconstruction des pics

Pour éviter les problèmes rencontrés précédemment, nous proposons deux nouvelles structures de données associées à la GAT : la liste locale des contributeurs ou **Local Contributors List (LCL)** et la matrice des contributions déjà utilisés ou **Used Contributors Matrix (UCM)**.

Le principe de la LCL est d'associer, en chaque point de la matrice d'accumulation, une liste exhaustive des points à l'origine des gradients ayant participé à l'incrémentation. Les « contributeurs » représentant les points de départ des gradients, la construction de la structure, illustrée par la figure 97, se fait de la manière suivante :

$LCL(\text{Ligne}, \text{Colonne}) = \{(\text{coordonnées contributeur } 1), \dots, (\text{coordonnées contributeur } n)\}$.

	1	2	3	4
1	\emptyset	\emptyset	LCL(1,3)	\emptyset
2	\emptyset	LCL(2,2)	LCL(2,3)	LCL(2,4)
3	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset
4	\emptyset	\emptyset	LCL(4,3)	\emptyset

$LCL(2,1) = LCL(3,3) = \emptyset$ (points d'origine des gradients)
 $LCL(2,2) = LCL(2,4) = \{(2,1)\}$
 $LCL(1,3) = LCL(4,3) = \{(3,3)\}$
 $LCL(2,3) = \{(2,1), (3,3)\}$
 $LCL(1,1) = LCL(1,2) = \dots = LCL(4,4) = \emptyset$

figure 97 principe de création de la "local contributors list" (LCL). Dans cet exemple, les LCL sont construites pour chaque point de la matrice à partir de deux points (vert et orange) générant chacun un gradient. Dans cette figure, seule les LCL sont représentées.

La matrice des contributeurs utilisés est constituée d'entiers et est de même taille que l'image. Pour chaque itération de recherche d'un pic dans l'accumulateur, la liste de contributeurs correspondant est analysée. Dans la matrice de contributeurs utilisés, on affecte le numéro du pic actuel aux coordonnées de chaque contributeur, sauf si elle est déjà affectée. Cette matrice contient donc, pour chaque contributeur, le numéro du centre potentiel d'un cercle auquel il pourrait participer.

Nous introduisons le principe qu'un contributeur ne peut appartenir qu'au premier cercle auquel il contribue et donc ne participer qu'à un seul centre de convergence. Dans les faits, lors de chevauchements de cercles, certains contributeurs pourraient appartenir à plusieurs cercles,

néanmoins, pour deux cercles clairement distincts, le nombre de ces doubles contributions restent marginal et le principe énoncé précédemment permet de traiter ces cas simplement, notre partit pris étant de privilégier la détection des plus grands cercles et/ou les moins occultés. La figure 98 montre un exemple de matrice UCM déjà remplie. P1 est le premier pic détecté, et ces contributeurs sont donc répertoriés par des « 1 », P2 est le pic secondaire, ses contributeurs sont répertoriés par des « 2 ». Bien qu'ayant des contributeurs en commun (les trois « 1 » au centre dans la 5e colonne), ces contributeurs sont rattachés exclusivement au pic 1.

0	1	1	1	0	2	2	2	0
1	0	0	0	1	0	0	0	2
1	0	P ₁	0	1	0	P ₂	0	2
1	0	0	0	1	0	0	0	2
0	1	1	1	0	2	2	2	0

figure 98 Principe de la matrice UCM

Ces deux structures nous permettent donc de conserver un historique de la construction de la matrice d'accumulation (LCL) et d'avoir une information supplémentaire pour chaque centre détecté (UCM).

Un des intérêts majeurs de la LCL est qu'elle permet de « déconstruire » l'accumulateur. En effet, lors de la détection d'un pic, au lieu d'utiliser un voisinage fixe pour l'éliminer en vue de la prochaine itération, il est possible de le supprimer intelligemment en décrémentant l'accumulateur le long des segments ayant donné naissance à ce pic. La déconstruction des pics basée sur les informations de la LCL donne des résultats beaucoup plus précis mais est, en contrepartie, assez coûteuse en ressources matérielles (mémoire et processeur).

L'UCM nous permet de rattacher d'éventuels pics « parasites » (pics dû à d'éventuels résidus de déconstruction) aux pics pertinents et précédemment détectés. Ceci nous permettant d'éliminer les éventuels faux positifs. Dans l'exemple donné dans la figure 96, cela permettrait, lors des deuxième et troisième itérations, de rattacher les centres détectés au premier centre. La figure 99 montre un exemple d'utilisation de l'UCM : il s'agit de détecter un cercle légèrement déformé pour lequel la GAT génère alors deux pics distincts, P1 et P2. Lors du processus de déconstruction de ces pics, l'UCM va attribuer l'indice du premier pic déconstruit (P1) à tous ses contributeurs, en particulier, cet indice va être attribué aux points contribuant également à P2. Lors de la déconstruction de P2, l'UCM montre qu'une majorité des contributeurs de ce pic sont déjà utilisés par P1 et par conséquent, qu'il faut fusionner ces deux pics.

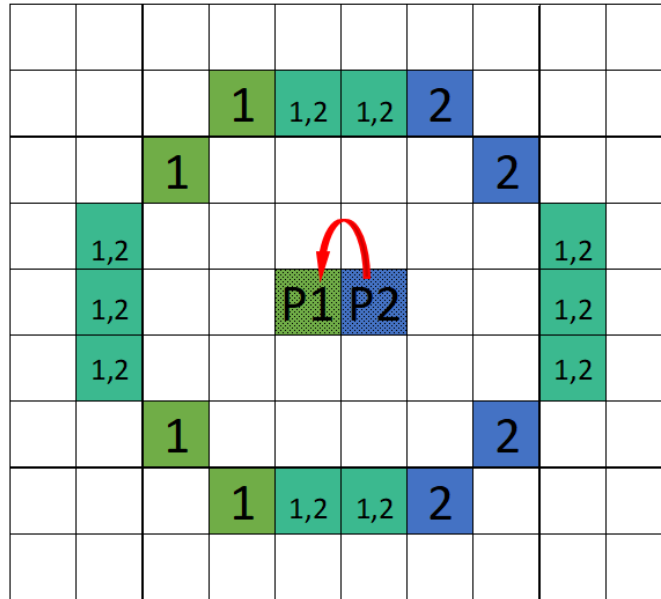


figure 99: Exemple de fonctionnement des UCM et de rattachement de deux pics.

La figure 100 reprend l'exemple précédent afin de comparer la méthode classique et la méthode que nous proposons. Cette figure illustre les avantages des LCL qui permettent une meilleure fiabilité dans la détection de cercles de tailles hétérogènes (voir [71]).

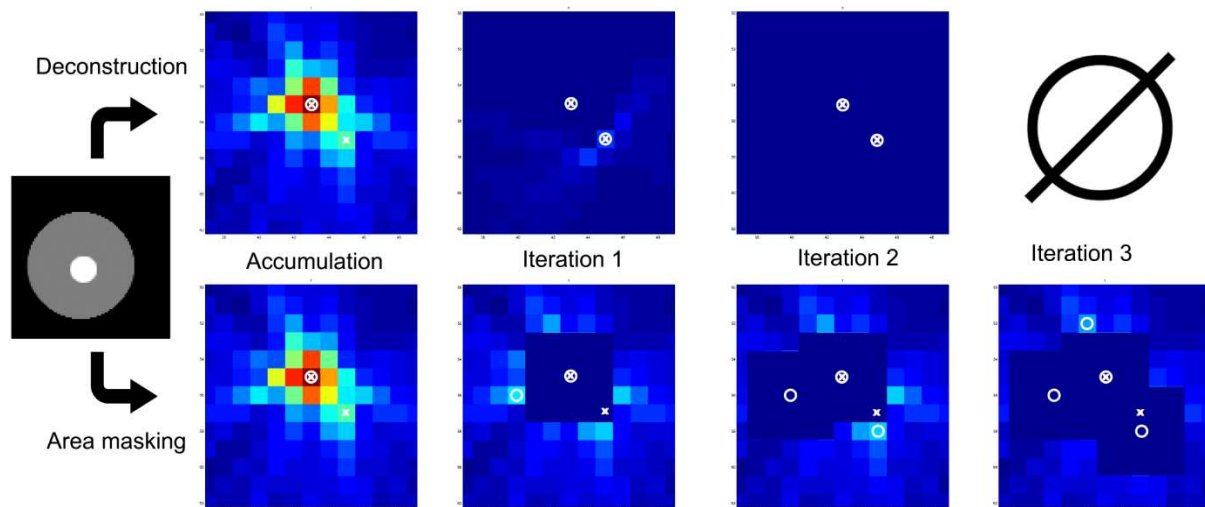


figure 100 : En haut, illustration de la méthode de déconstruction de l'accumulateur, comparée à, en bas, la méthode classique avec exclusion de voisinage. Les x blancs sont les centres théoriques à trouver, les o blancs sont les centres effectivement "vus" par la méthode.

f. Problème de la condition d'arrêt

Si les LCL nous permettent de proposer une alternative améliorant la précision de la GAT par rapport à l'usage des voisinages d'exclusion, la recherche de pics dans la matrice

d'accumulation reste une méthode itérative et il nous faut donc répondre à la question de la condition d'arrêt.

Le procédé que l'on trouve dans la littérature [52] pour cette condition d'arrêt est de fixer un seuil en deçà duquel les pics ne seront plus considérés. Le plus souvent, il s'agira d'un pourcentage de la valeur maximale de la matrice d'accumulation²⁰. Cette méthode se révèle insuffisante pour nous pour deux raisons :

- Le seuil est fixé manuellement, ce qui nuit à notre objectif d'automatisation.
- Ce seuil impose tacitement d'avoir une idée *a priori* sur la variabilité de taille des cercles recherchés car la taille du pic dépend directement de la taille du cercle qui l'engendre. Les plus petits cercles risquent donc d'être oubliés car générant des pics d'intensités trop faibles par rapport au pic du plus grand cercle présent.

Afin de déterminer automatiquement une condition d'arrêt contextuelle à chaque image analysée, nous faisons les remarques suivantes :

- Les valeurs dans la matrice d'accumulation sont de deux natures, d'une part, les pics qui sont générés par les formes recherchées, d'autre part, un bruit de fond généré par les gradients aléatoires présents dans l'image, qui va selon toute vraisemblance comporter lui aussi des maxima locaux.
- Par construction, les valeurs associées aux pics sont *a priori* supérieures au bruit de fond.

L'idée pour la condition d'arrêt est donc d'obtenir une estimation, pour chaque image, du bruit de fond présent dans la matrice d'accumulation. Pour obtenir cette estimation, nous partons du pic d'intensité maximale dans la matrice d'accumulation. Les LCL contiennent, par construction, l'ensemble des points ayant participé à la construction de ce pic. Nous partons de l'idée que, sauf cas particulier (cercle secondaire centré sur le périmètre d'un autre), les pics ne peuvent être localisés au même endroit que les contributeurs. Nous utilisons donc la valeur moyenne de la matrice d'accumulation à l'emplacement des contributeurs du plus grand pic pour estimer la valeur moyenne du bruit de fond et en déduire un seuil (condition d'arrêt) contextualisé pour chaque image.

²⁰ <https://fr.mathworks.com/help/images/ref/houghpeaks.html>

g. Détermination du rayon des cercles

Les LCL nous permettent également de proposer une méthode robuste pour la détermination des rayons des cercles détectés ; il s'agit d'une adaptation de la méthode proposée par Illingworth *et al.* et Kimme *et al.* [52][47].

Dans l'approche que nous avons proposé dans [71] , nous n'utilisons pas au préalable les détections de contours classiques (Canny, Sobel,...). Nous préférons exploiter tous les gradients significatifs de l'image. Cela donne à l'algorithme une meilleure robustesse dans le cas des contours flous.

La LCL nous fournit directement les distances entre les points générant les gradients et le centre candidat. Il est donc possible de tracer un histogramme des distances « contributeurs-centre » et de le normaliser²¹. Les contributeurs étant, de par la méthode de calcul des gradients employée, étalés de part et d'autre du contour exact du cercle candidat, le calcul du rayon est effectué par l'ajustement de cet histogramme à une loi normale. L'espérance de cette loi donne alors une estimation fiable du rayon du cercle.

i. Cas des cercles concentriques

Dans le cas de cercles concentriques, nous déterminons le nombre de modes de cet histogramme puis nous ajustons un nombre adapté de lois normales afin d'estimer précisément le rayon de chacun. Voir figure 101.

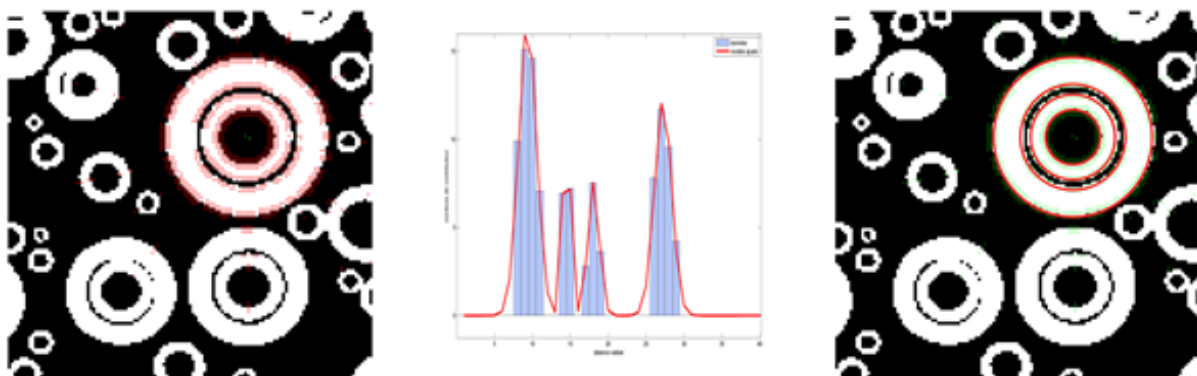


figure 101 Calcul de rayon dans le cas concentrique. A) En rouge, les contributeurs pour le centre 1 B) l'histogramme des distances radiales et les lois normales ajustées, C) les cercles déterminés par les sigmas des lois normales.

²¹ La normalisation s'effectue en divisant les effectifs des classes de l'histogramme par $2\pi r$

Cette méthode permet de distinguer deux cercles **concentriques** avec des rayons dont la différence est d'au moins deux pixels comme (voir figure 101). Cette méthode permet également de déterminer précisément les rayons de cercles partiellement occultés. Cette méthode est en mesure de fournir une estimation de rayon pour des arcs ne représentant qu'une petite fraction d'un cercle complet. Afin d'éviter une surinterprétation des pics dans l'accumulateur, nous imposons une limite basse sur le nombre de pixels n_d pris en compte dans l'estimation du rayon de chaque cercle supposé : n_d doit être supérieur à 20% du périmètre supposé $2\pi d$ (d étant la distance entre les contributeurs pris en compte et le centre supposé). Autrement dit, nous éliminons les arcs ou les cercles fragmentés représentant moins de 20% d'un cercle complet.

ii. Cas des cercles quasi-concentriques

Dans le cas de cercles de diamètres différents et quasi concentriques, leurs centres étant séparés de quelques pixels, la forme du pic créé par l'accumulation des gradients ne permet pas toujours de séparer clairement les centres. Les cercles seront détectés avec leur diamètre respectifs corrects mais seront tous centrés sur le même point, donc avec une légère erreur. Nous proposons d'améliorer la précision de la discrimination des centres en introduisant un critère de similarité entre les contributeurs de chaque point de l'accumulateur. Nous proposons d'utiliser l'indice de Jaccard pour calculer ce critère. Cet indice [73] a pour but d'évaluer la similarité entre deux ensembles $E^1 = \{e_1^1, e_2^1, \dots, e_n^1\}$ et $E^2 = \{e_1^2, e_2^2, \dots, e_m^2\}$. Dans sa version originale, il est donné par :

$$J(E^1, E^2) = \frac{\text{Card}(E^1 \cap E^2)}{\text{Card}(E^1 \cup E^2)}$$

Il existe également une adaptation de cet indice pour les ensembles binaires. En considérant deux ensembles binaires $E^1 = \{e_1^1, e_2^1, \dots, e_n^1\}$ et $E^2 = \{e_1^2, e_2^2, \dots, e_n^2\}$ de même dimension, l'indice est donné par :

$$J(E^1, E^2) = \frac{M_{11}}{n - M_{00}}$$

Où $M_{11} = \text{Card}(e_i^1 = 1 \ \& \ e_i^2 = 1)$, $M_{00} = \text{Card}(e_i^1 = 0 \ \& \ e_i^2 = 0)$ et n est le nombre d'élément dans chaque ensemble.

Pour chaque point accumulé, un code binaire c est déterminé en fonction de la distance le séparant du point d'origine, nous noterons cette distance d . Nous définissons le code binaire associé à chaque point accumulé par $c = 2^{\hat{d}}$, avec \hat{d} la distance arrondie à l'entier le plus proche. Nous codons c sur 64 bits, ce qui permet donc d'évaluer les similitudes jusqu'à une distance de 64 pixels.

Lors du processus d'accumulation, en chaque point, nous cumuloons les codes binaires en utilisant l'opérateur binaire *or*.

Ce procédé permet de créer une carte représentant la similarité en terme de distance au point original pour chaque point de l'accumulateur. Lorsqu'un pic dans l'accumulateur représente plusieurs cercles quasi concentriques, ce procédé permet d'apporter une information supplémentaire permettant de distinguer les points de convergence correspondant à chaque cercle et de distinguer les centres proches.

La figure 102 présente une image avec deux cercles quasi concentriques (centres espacés de deux pixels sur l'axe x) et une carte représentant la similarité entre les points de l'accumulateur obtenu. Dans cette carte de similarité, nous avons coloré respectivement en rouge et en vert les points de l'accumulateur participant majoritairement au premier cercle et second cercle au sens de la similarité. Pour cet exemple, nous avons choisi un seuil de 0.8, autrement dit, nous considérons que deux points de l'accumulateur participent au même cercle si $J > 0.8$ pour ces deux points.

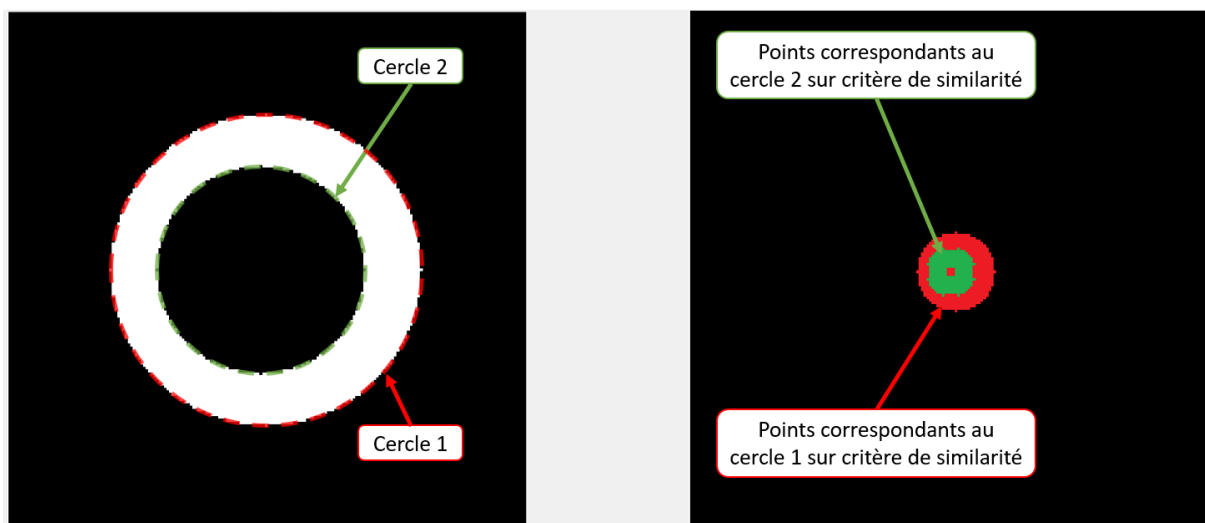


figure 102: Les deux cercles dans l'image originale (à droite) ont un centre espacé de deux pixels sur l'axe x, la figure de gauche représente les points ayant une similarité supérieure à 0.8 dans l'accumulateur ($J > 0.8$)

h. Comparaison GAT/LCL/UCM versus CHT

La figure 103 permet de comparer les résultats obtenus en employant la méthode de transformée de Hough par gradient, les LCL et l'UCM ou en employant la transformée de Hough circulaire classique. Ces deux méthodes sont appliquées à une image synthétique (a) et à une image réelle (d). Sur les deux exemples, on peut constater que seuls les cercles pertinents sont détectés avec la GAT, les LCL et l'UCM (b, e) alors que la transformée de Hough circulaire donne un nombre important de faux positifs (c, f).

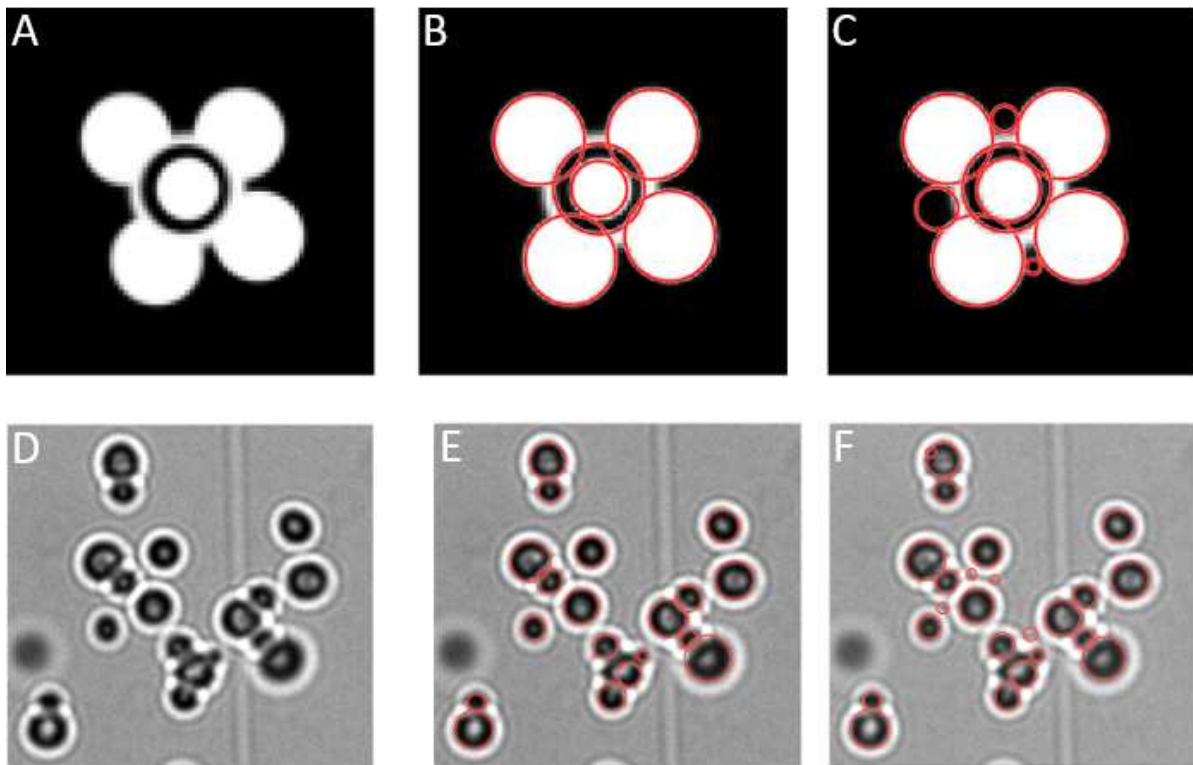


figure 103: A et D: image synthétique et image réelle, B et E: détection de cercles utilisant la GAT, les LCL et l'UCM, C et F : détection de cercles utilisant la transformée de Hough circulaire

i. Performance de la méthode

L'apport principal de la méthode que nous proposons (GAT/LCL/UCM, alias Daneel [74]) est, dans un mode de fonctionnement entièrement automatique, de réduire au maximum le nombre de faux positif lors de la détection de cercles. Afin de quantifier cette performance, nous avons sélectionné deux images, une synthétique et une réelle, pour lesquelles nous avons manuellement déterminé la position exacte de chaque cercle à détecter. Ces vérités de terrain nous permettent de quantifier avec exactitude le nombre de vrais positifs, faux positifs et faux négatifs obtenus avec chaque méthode et ainsi de calculer la F-mesure associée (méthode

présentée page 156). Nous avons comparé les performances de notre méthode aux performances de la CHT implémentée dans Matlab® recherchant les cercles « blancs » ou les cercles « noirs » (paramètre ‘objectPolarity’ de la méthode « imfindcircles »²²).

Pour les besoins de cette comparaison, nous avons utilisé une condition d’arrêt identique, en fixant manuellement un seuil T que nous avons fait varier entre 0.5 et 0.99. La notion de sensibilité de la méthode est calculée à partir de ce seuil selon la formule :

$$sensitivity = 1 - T / Max(A)$$

où A est la matrice d’accumulation.

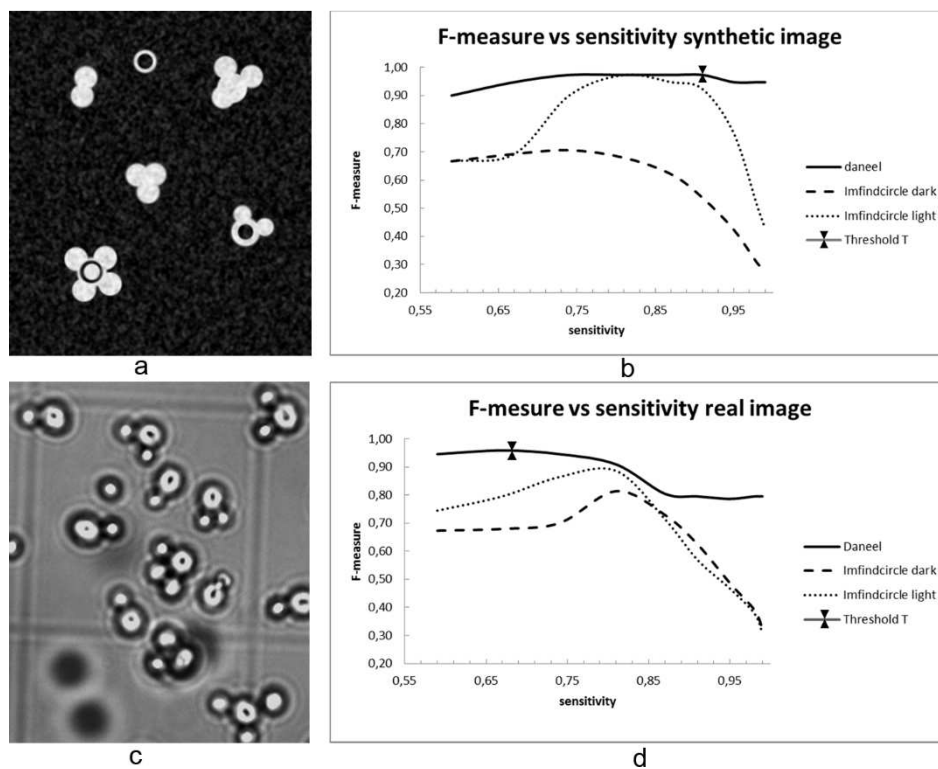


figure 104: F-mesure obtenues pour les méthode GAT/LCL/UCM et CHT. a, c: images synthétique et réelle utilisées. b, d: évolution de la F-mesure pour ces deux images en fonction de la sensibilité de la méthode. Le seuil T (Threshold) est le seuil obtenu automatiquement avec notre méthode (Daneel)

La figure 104 montre les F-mesures (voir page 156) obtenues pour chaque méthode. Ces courbes montrent que quel que soit le niveau de sensibilité employé, la méthode que nous proposons propose une meilleure F-mesure que la CHT classique. Autrement dit, à condition

²² <https://fr.mathworks.com/help/images/ref/imfindcircles.html>

d'arrêt équivalente, la précision de la détection des cercles est meilleure avec la GAT associée aux LCL et UCM.

Sur les courbes correspondant à notre méthode, nous avons également figuré le seuil T obtenu automatiquement pour déterminer la condition d'arrêt et dont on peut constater qu'il se positionne de manière optimale pour ces deux exemples.

4. Résultats

L'emploi de la transformée de Hough par gradient, des LCL et des UCM [61], [71], [75] permet d'automatiser et d'optimiser la détection des formes pseudo-circulaires dans une image. Il est possible, sur la base de ce résultat, d'obtenir un comptage automatique, fiable et robuste. La figure 105 montre les comptages obtenus manuellement (14 volontaires) et avec la méthode proposée (Daneel) pour une sélection de treize images parmi les 137 de notre étude ; les comptages sont positionnés sur les deux premiers axes factoriels de l'analyse en composantes principales (ACP) [76]. Ce graphique permet de constater que les comptages réalisés automatiquement se positionnent de manière centrale dans l'ACP, ce qui indique qu'ils peuvent être considérés comme consensuels. Les volontaires pour réaliser le comptage des cellules n'étant pas tous biologistes, il est intéressant de constater que le léger décentrage de Daneel le rapproche des experts (les « non-experts » étant Paul, Ludo, Ambroise et Manu)

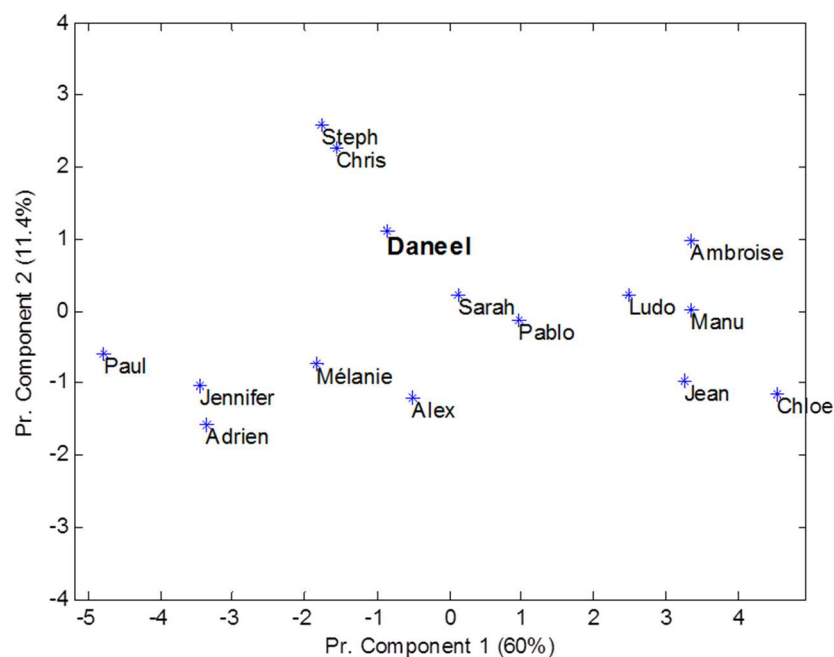


figure 105 Analyse en composante principale des comptages humains & machine (Daneel)

Le résultat final est illustré par la figure 106 qui présente une image, avec, en surimpression :

- La zone d'intérêt déterminée après étude de la grille de comptage (en jaune).
- Un marquage de chaque cellule détectée (points rouges).
- Le nombre de cellules comptées (en haut à gauche).

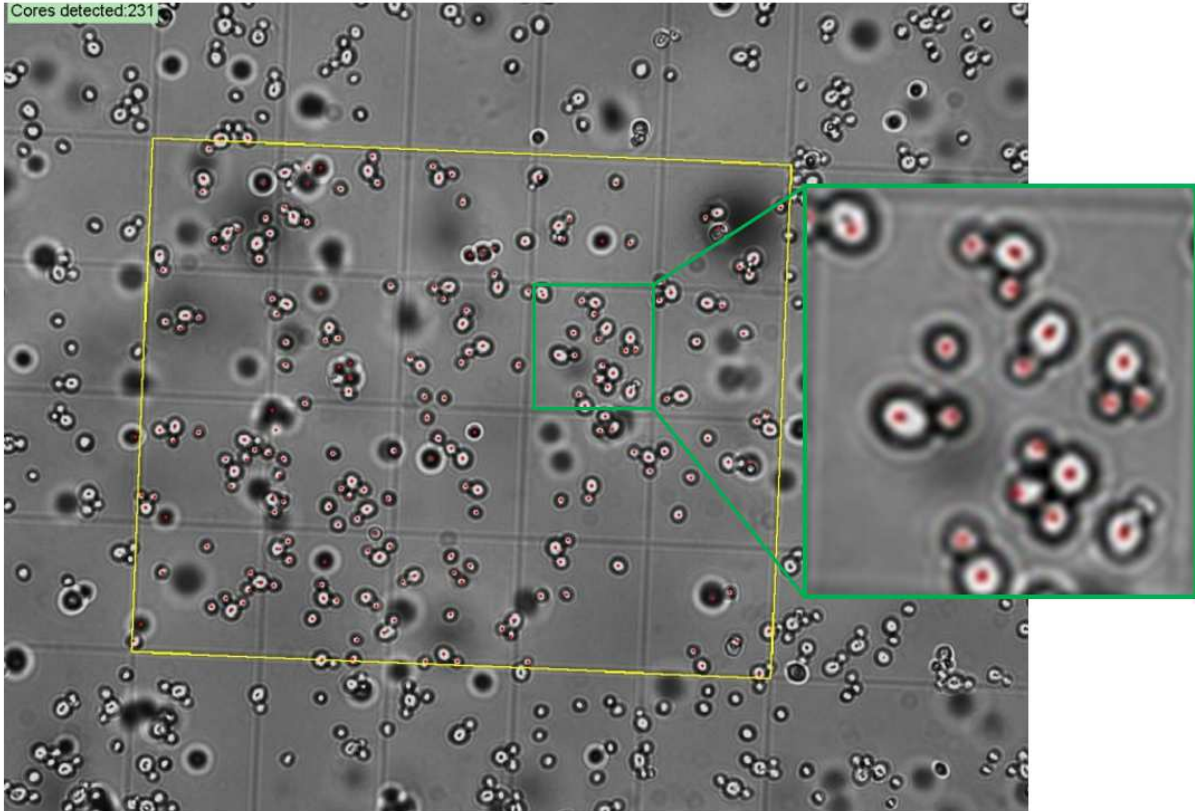


figure 106 Image extraite de l'échantillon de comptage, en jaune la R.O.I. , en rouge les cellules marquées comme comptées, le résultat du comptage apparaît en haut à gauche.

5. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de proposer une alternative efficace aux comptages manuels et aux problèmes qui en découlent (reproductibilité, subjectivité, coût). Notre approche nous permet de répondre à ces trois problèmes en fournissant des comptages cellulaires fiables et répétables beaucoup plus rapidement que s'ils étaient effectués manuellement. Il faut environ cinq minutes à un humain pour compter une lame alors que Daneel ne nécessite qu'environ vingt secondes en utilisant Matlab® 2016 et une machine équipée d'un processeur intel® core i5 cadencé à 3GHz et 8Go de mémoire RAM.

La méthode proposée dans le second chapitre nous permet de déterminer précisément les paramètres de la grille de comptage et de définir une zone d'intérêt. Avec ces informations et le comptage précis, il est alors possible de répondre à notre objectif principal et de fournir automatiquement la concentration cellulaire de l'échantillon étudié.

Chapitre 4 : Caractérisation de structures intracellulaires : estimation du nombre d'agrégats ribo nucléoprotéiques (RNPs)

1. Introduction et problématique

Dans les deux chapitres précédents, nous avons vu comment compter les cellules présentes sur une lame de comptage. Ces comptages ont pour but de quantifier la quantité de cellules suite à un traitement. Malheureusement, ils ne permettent pas d'apporter d'information sur les mécanismes conduisant à la mort ou à la survie des cellules prises individuellement. Pour ce faire, il est important d'étudier les mécanismes internes de la cellule, et de visualiser les modifications morphologiques des organites. Une voie récente et prometteuse réside dans l'observation de l'agrégation de certaines parties de la cellule en présence d'un stress.

Dans le cadre des travaux menés à l'UMR PAM par le Dr Stéphane Guyot, des cultures d'une souche mutante de *saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées. Cette souche produit des protéines Pab1p-GFP ayant une propriété de fluorescence. Les cultures ont été soumises à des hausses de températures (stress thermique) conduisant à l'apparition d'agrégats ribo nucléoprotéiques. La température est élevée jusqu'à 50°C de façon brutale ou en suivant une progression (choc ou rampe). Protter [48] décrit la formation d'agrégats ribo-nucléoprotéiques dans le cytoplasme des cellules soumises à un stress (figure 107).



figure 107: Formation d'agrégats ribo nucléoprotéique dans une cellule. En présence de stress, les protéines, ARNm et d'autres éléments présents dans le cytoplasme s'agrègent [48]

L'étude fonctionnelle de la formation de ces agrégats est faite en observant une cellule isolée. Afin d'avoir une vue plus générale de leur développement, il est intéressant de **généraliser et d'automatiser cette observation à toutes les cellules. Traiter les cellules en grand nombre**

permet alors d'obtenir une information statistique sur la formation des agrégats en fonction des stress appliqués aux cultures. Cette information pourra être corrélée avec les taux de survie des cellules afin de déterminer plus finement le rôle de ce mécanisme d'agrégation dans la résistance des cellules aux différents traitements. Pour cela, 210 images ont été acquises, ce qui représente environ 5000 cellules identifiables. Afin de disposer d'une information statistique sur le développement des agrégats ribo nucléoprotéiques pour chaque image, il faut déterminer leur stade de développement qui va être caractérisé par le nombre d'agrégats présents dans chaque cellule.

Grâce à une première expérience de comptages manuels par des experts (voir page 159), nous avons pu constater que le **dénombrement précis des agrégats est impossible**. Au lieu d'un comptage exhaustif nous avons opté pour une approche d'estimation plus indirect. En effet, l'observation des images d'agrégats montre intuitivement qu'il existe une corrélation entre le nombre de agrégats et l'aspect granuleux de la cellule. De cette observation, nous avons opté pour une approche basée sur l'analyse de texture. Compte tenu du nombre important de cellules à traiter, un des objectifs va être l'**automatisation du processus d'estimation**.

2. Matériel et méthodes

a. Qu'est-ce que la fluorescence ?

La fluorescence est un mot inventé par Stokes en 1852 [77] pour décrire l'émission d'une lumière provoquée par l'excitation des électrons d'une molécule. La fluorescence est un phénomène très répandu dans la nature, que ce soit dans le règne végétal ou animal. Une molécule fluorescente est appelée fluorochrome et a pour propriété que lorsqu'elle absorbe un photon avec une énergie e_1 , elle émet en retour un photon avec une énergie e_2 inférieure. En d'autres termes, en excitant un fluorochrome approprié avec une lumière invisible de longueur d'onde λ_1 courte, dans le domaine de l'ultraviolet, la lumière émise en retour aura une longueur d'onde λ_2 dans le domaine du visible (figure 108).

$$e_1 = h\nu_1$$

$$e_2 = h\nu_2$$

$$h\nu_1 > h\nu_2 \rightarrow \lambda_1 < \lambda_2$$

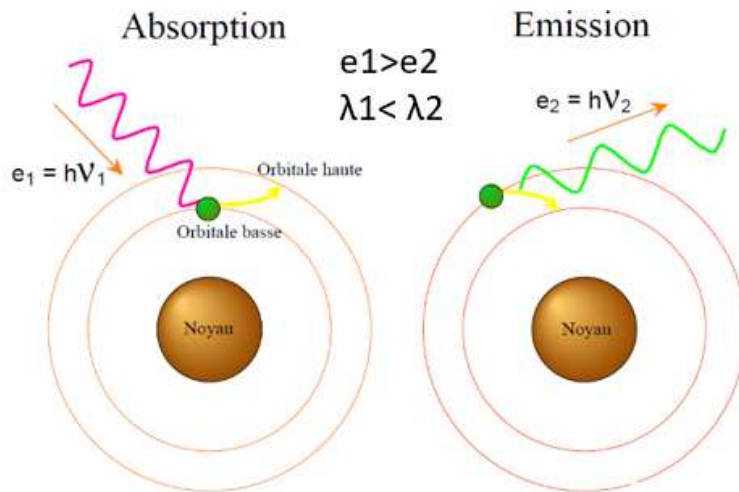


figure 108: illustration du phénomène de fluorescence, un photon e_1 est absorbé, un photon e_2 est émis (d'après Yves Usson)²³

Il est possible, pour les études biologiques, de créer des espèces mutantes ayant pour particularité de synthétiser des molécules fluorescentes. Cette possibilité est largement utilisée pour les observations intracellulaires mais pose néanmoins un problème. La lumière utilisée pour exciter les fluorochromes est nocive pour les cellules et risque de les tuer (phénomène de photo-toxicité). Dans les faits, il est très difficile d'observer cette fluorescence sans impacter directement le taux de survie de la culture observée. Ce problème est résolu en utilisant la technique de la microscopie biphotonique.

b. La microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique est issue directement des travaux de Maria Göppert-Mayer, Prix Nobel de Physique 1932. En 1931 [78], Elle a démontré la possibilité d'exciter un atome par deux photons représentant deux quantas d'énergie (figure 109). La microscopie biphotonique a été développée en 1990 par Webb, Denk et Strickler [79]. Le principe est donc d'utiliser deux photons de moindre énergie comme source d'excitation pour le fluorophore. En pratique, l'énergie d'excitation e_1 fournie par un photon de longueur d'onde λ_1 sera fournie par deux photons d'énergie $e_2 = \frac{e_1}{2}$ et de longueur d'onde $\lambda_2 = 2\lambda_1$ (figure 110). Le phénomène d'excitation par deux photons est néanmoins extrêmement peu probable. Pour qu'il puisse se produire, il est nécessaire que les deux photons excitent la molécule dans un intervalle de temps extrêmement court, de l'ordre de la femto seconde. Par exemple, en éclairage naturel, un fluorochrome comme la rhodamine B absorbe deux photons tous les dix millions d'années [80].

²³ <http://membres-timc.imag.fr/Yves.Usson/COURS/2-PHOTONS.pdf>

Ce problème est résolu en utilisant des lasers pulsés. Ces lasers sont très puissants et ont pour propriété de délivrer la lumière dans un intervalle de temps très court ($\sim 100\text{fs}$). En focalisant le rayon d'un laser pulsé en un point précis, on obtient une densité maximale de photons, à la fois dans le temps et dans l'espace, ce qui permet une augmentation de la probabilité d'absorption de deux photons au point focal rendant le phénomène d'absorption de deux photons utilisable pour déclencher la fluorescence et réaliser des observations.

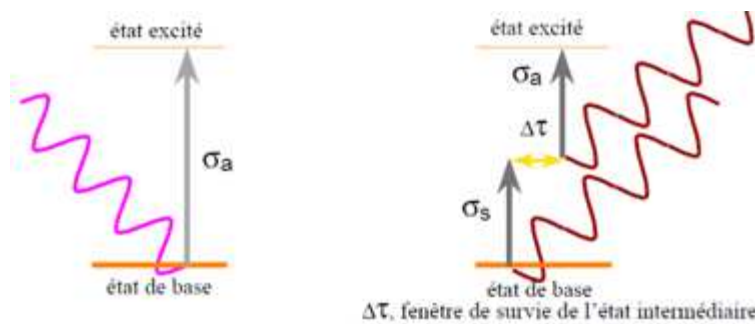


figure 109: Excitation d'un atome par un photon (gauche) et par deux photons (droite), d'après Yves Usson²⁴

Avec cette technique, les photons d'excitation passent du domaine de l'ultraviolet au domaine de l'infrarouge (IR), ce qui est moins nocif pour les cellules observées et permet leur survie même s'il faut faire attention aux phénomènes d'échauffement lors du balayage par le laser IR.

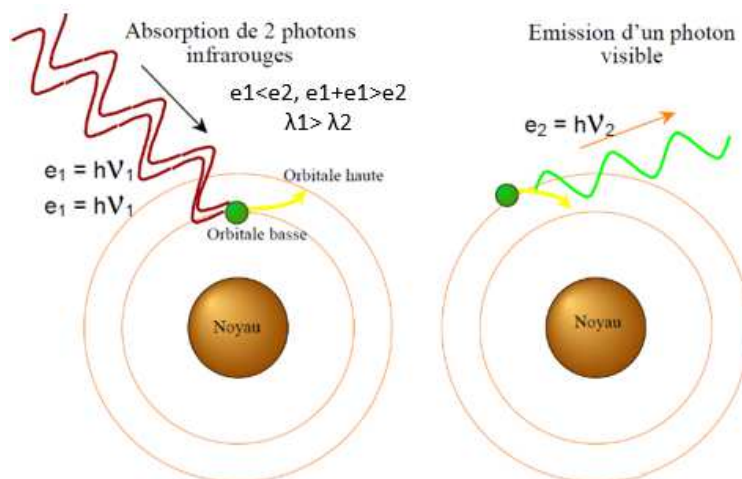


figure 110: Fluorescence déclenchée par deux photons dans le cadre de la microscopie biphotonique, d'après Yves Usson²⁵

²⁴ <http://membres-timc.imag.fr/Yves.Usson/COURS/2-PHOTONS.pdf>

²⁵ <http://membres-timc.imag.fr/Yves.Usson/COURS/2-PHOTONS.pdf>

c. Les méthodes de description de texture

La notion de texture en elle-même est une notion assez complexe dont il n'existe pas de définition unifiée [40]. La notion de texture peut être définie par la perception que l'on a d'une surface ou d'une matière et qui sera caractérisée par des adjectifs tels que « lisse », « granuleux », « rugueux », etc... Dans le domaine de l'image, la notion de texture est définie pour une zone dont la perception est homogène. Cette zone peut alors être décrite par un ensemble de paramètres caractéristiques appelés descripteur de texture. Un descripteur efficace est tel que différentes zones perçues comme ayant la même texture sont représentées par des paramètres similaires alors que des zones présentant des textures perçues comme différentes sont discriminées par ces mêmes valeurs.

Il existe de nombreux paramètres permettant de décrire la texture d'une image [81], [82], selon deux approches principales, statistique et structurelle. Sans être exhaustif, nous pouvons citer :

- Les matrices de longueur de plages [40]
- Les champs de Markov [83]
- La modélisation d'histogramme [84]
- La modélisation par ondelettes [85], [86]

Nous avons utilisé trois ensembles de paramètres représentant trois approches, fréquentielle, statistique et structurelle pour décrire l'aspect texturé des cellules que nous allons analyser :

- Les descripteurs de Fourier [87], [88], dans le but d'avoir un point de vue fréquentiel sur l'image de la cellule.
- Les descripteurs de Haralick [89] qui sont l'approche statistique de référence lorsqu'il s'agit de décrire une texture.
- Les descripteurs de Zernike [90], compte tenu de la nature circulaire des cellules, les descripteurs de Zernike sont particulièrement adaptés pour les décrire structurellement.

Nous allons maintenant détailler ces trois méthodes.

i. Descripteurs de Fourier

Les descripteurs de Fourier ([87], [88]) sont basés sur la transformée de Fourier \hat{f} de la fonction f donnée par l'équation suivante :

$$\hat{f}(\xi) = \int_{\mathbb{R}^2} f(x) e^{-i\langle x|\xi\rangle} dx$$

où $\langle . | . \rangle$ est le produit scalaire sur \mathbb{R}^2 , $f(x)$ est intégrable sur le plan.

Le descripteur de Fourier $D_{\hat{f}}$ est défini par l'équation suivante :

$$D_{\hat{f}}(\lambda) = \int_0^{2\pi} |\hat{f}(\lambda, \theta)|^2 d\theta$$

Dans cette équation, $\hat{f}(\lambda, \theta)$ est la transformée de Fourier en un point ξ dont les coordonnées polaires sont (λ, θ) .

Géométriquement, le descripteur de Fourier est l'intégrale de la transformée de Fourier le long d'un cercle de rayons λ .

On peut donc interpréter chaque λ comme une fréquence. Sommer sur l'ensemble du cercle de rayon λ représente l'impact de cette fréquence dans l'ensemble des directions.

Une propriété importante du descripteur de Fourier, obtenue par construction, est son invariance par rotation de l'image d'origine.

Dans le domaine de l'imagerie numérique, l'espace est discrétisé et la transformée de Fourier discrète est définie par l'équation suivante :

$$FFT(k_x, k_y) = \frac{1}{\sqrt{N_x N_y}} \sum_{n_x=0}^{N_x-1} \sum_{n_y=0}^{N_y-1} f(n_x, n_y) e^{-2i\pi \frac{k_x n_x}{N_x}} e^{-2i\pi \frac{k_y n_y}{N_y}}$$

Dans cette équation (k_x, k_y) sont les coordonnées dans la transformée, (n_x, n_y) sont les coordonnées dans l'image source et (N_x, N_y) est la taille de l'image source.

Le descripteur de Fourier est approximé en sommant le module de la *FFT* le long de cercles iso-fréquentiels discrétisés. Pour une approximation plus juste, un soin particulier est apporté au tracé de ces cercles concentriques de manière à ce qu'ils couvrent tout l'espace sans se chevaucher.

La figure 111 présente un exemple de descripteur de Fourier calculé pour une image originale et après une rotation de 90° . Le descripteur est normalisé, afin que ses valeurs soient comprises dans l'intervalle $[0,1]$. Pour les plus grandes valeurs de λ on observe une très légère différence

entre les deux descripteurs obtenus, celle-ci est due aux approximations de calcul liées à la discrétisation.

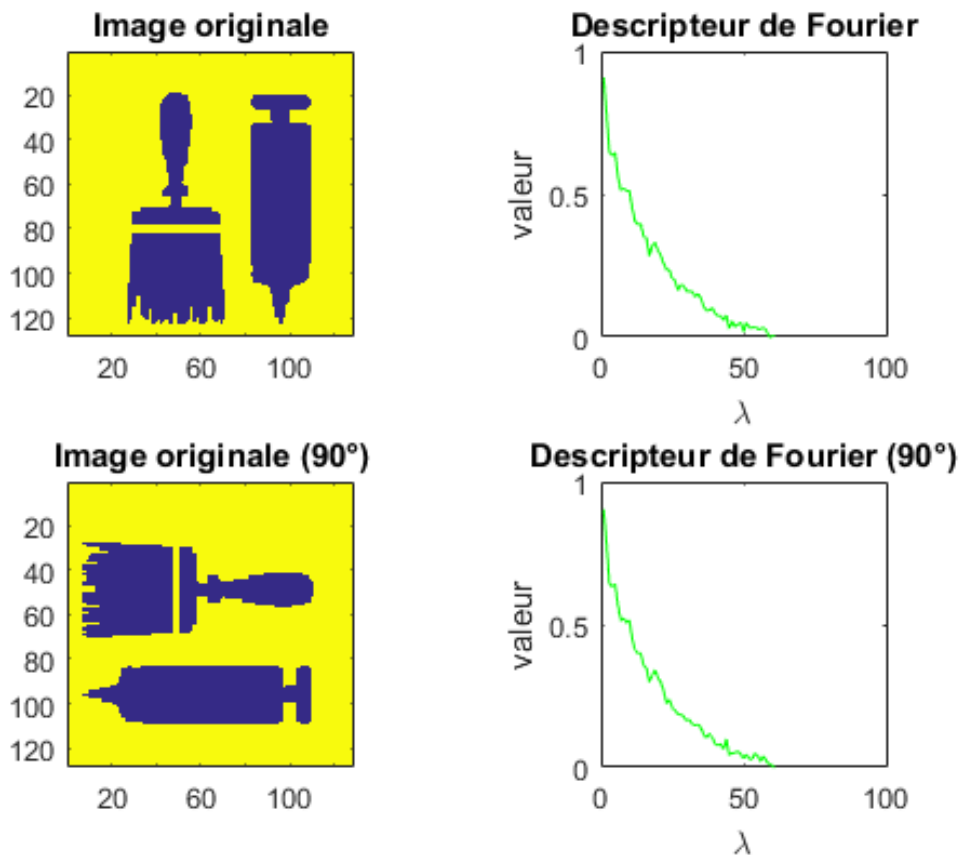


figure 111: exemple de descripteur de Fourier pour une image originale et ayant subi une rotation de 90°

ii. Descripteurs de texture de Haralick

Les descripteurs de texture définis par R. Haralick ([89]) sont l'outil de référence pour l'étude de la texture dans l'image.

Les descripteurs de Haralick sont calculés sur la base de la matrice de cooccurrence des niveaux de gris dans l'image. Pour construire cette matrice, il s'agit, dans une direction et avec un décalage de pixels donné (offset), de compter le nombre de répétitions d'une valeur de niveau de gris succédant à une autre.

Dans la pratique, les niveaux de gris d'une image sont la plupart du temps codés sur huit, douze ou seize bits : il en résulte une matrice de cooccurrences d'une taille variant de 256×256 à 65536×65536 . En considérant une image d'une taille de 1280×1024 , suivant l'offset utilisé, on obtient environ 1300000 entrées pour la matrice de cooccurrences.

Quand on étudie les textures, il est courant de travailler sur des images de petites tailles ou des zones réduites d'une image plus grande. Par exemple, en considérant une étude sur une image ou un patch de 64x64 codé sur 8 bits, on obtient environ 4000 entrées et donc, une valeur moyenne de 0.06 pour la matrice de cooccurrences. Les valeurs contenues dans la matrice étant par construction entières, il apparait donc qu'un codage trop fort ou une taille d'image réduite engendre une matrice de cooccurrences contenant en grande majorité des valeurs nulles la rendant inexploitable et peu pertinente.

Pour être exploitable, la taille de la matrice est réduite en sous-échantillonnant les niveaux de gris originaux. Dans l'exemple donné en figure 112, le calcul de la matrice de cooccurrence est réalisé en ré-échantillonnant l'image originale de huit à deux bits, passant ainsi de deux cents cinquante-six à quatre niveaux de gris.

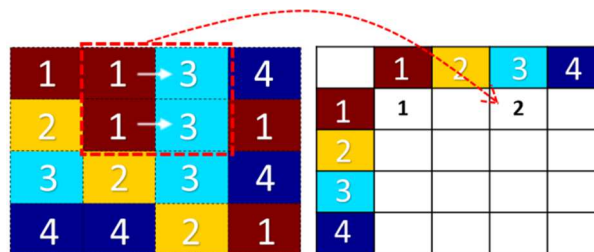


figure 112: construction de la matrice de cooccurrences avec un offset de [1,0] et un échantillonnage des niveaux de gris sur 2 bits, à gauche, l'image échantillonnée, à droite, la matrice de cooccurrences

Les descripteurs de Haralick consistent en une liste de quatorze valeurs algébriques dont nous détaillons le calcul dans l'annexe 4. La figure 113 donne un exemple de valeurs obtenues pour deux images de textures différentes extraites du catalogue de Brodatz²⁶ [91]. Sur cet exemple, les valeurs liées à la variance semblent permettre de discriminer les deux images.

²⁶ <http://www.ux.uis.no/~tranden/brodatz.html>

	Brodatz #5	Brodatz #6
Angular Second Moment (Energy)	0,08	0,16
Contrast	0,71	1,70
Correlation	0,91	0,48
Variance	26,30	6,05
Inverse Difference Moment (Homogeneity)	0,78	0,74
Sum Average	9,52	4,23
Sum Variance	105,07	22,76
Sum Entropy	2,52	1,90
Entropy	4,34	3,47
Difference Variance	0,60	1,54
Difference Entropy	0,90	1,11
Information Measure of Correlation I	-0,44	-0,21
Information Measure of Correlation II	0,95	0,74
Maximal Correlation Coefficient	0,14	0,24

figure 113: Valeurs des descripteurs texturaux de Haralick pour 2 images de textures extraites du catalogue de Brodatz

iii. Descripteurs de Zernike

Les polynômes de Zernike portent le nom de leur créateur, Frederik Zernike, prix Nobel de physique en 1953 pour ses travaux sur le microscope à contraste de phase. Dans le cadre de ses travaux sur l'optique géométrique, F. Zernike définit une série de polynômes orthogonaux sur le disque unité qui lui permettent de décrire un front d'onde²⁷ par une combinaison linéaire de ces polynômes. Cette décomposition permet de décrire l'origine des défauts des lentilles optiques. En particulier, certains des premiers coefficients décrivent les principaux défauts, comme l'astigmatisme, le coma ou les erreurs de focalisation.

Les polynômes de Zernike peuvent se décomposer en fonctions paires et impaires dont les parties radiales $R_{n,m}(\rho)$ sont donnée par l'équation suivante :

$$R_{n,m}(\rho) = \sum_{k=0}^{\frac{(n-|m|)}{2}} \frac{(-1)^k [(n-k)!] \rho^{n-2k}}{k! \left(\frac{n+|m|}{2} - k\right)! \left(\frac{n-|m|}{2} - k\right)!}$$

²⁷ Le **front d'onde** est une surface d'égale phase pour une onde donnée, c'est-à-dire la surface dessinée par les points ayant mis le même temps de parcours depuis la source.

Dans cette équation, ρ est la distance radiale normalisée, n et m sont des entiers naturels tels que $n - m$ est positif ou nul et pair. Les fonctions paires en θ sont définies par :

$$Z_{n,m}(\rho, \theta) = R_{n,m}(\rho) \cos(m\theta)$$

Les fonctions impaires en θ sont définies par:

$$Z_{n,-m}(\rho, \theta) = R_{n,m}(\rho) \sin(m\theta)$$

Avec θ l'angle d'azimut exprimé en radian.

Il est également possible d'écrire les fonctions de Zernike sous forme complexe :

$$V_{n,m}(\rho, \theta) = R_{n,m}(\rho) e^{im\theta}$$

Les moments de Zernike, $A_{n,m}$, sont alors définis par l'équation suivante :

$$A_{n,m} = \frac{1+n}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^1 f(\rho, \theta) \bar{V}_{n,m}(\rho, \theta) \rho d\rho d\theta$$

Dans cette équation, $f(\rho, \theta)$ correspond à l'image originale en coordonnées polaires.

Dans les faits, il est possible de décomposer sur cette base n'importe quelle fonction définie sur le disque unité, la décomposition est alors donnée par les coefficients $A_{n,m}$. Chaque $V_{n,m}$ joue alors le même rôle que e^{int} dans une décomposition de Fourier (equation page 138). Les fonctions de Zernike constituent une base orthonormée de l'espace des fonctions de carré sommable sur le disque unite. Les inégalités de Bessel et l'identité de Parseval restent applicables [92].

Nos travaux, s'articulant autour de l'analyse de cellules dont la forme est quasi circulaire, la décomposition des images sur les fonctions de Zernike est particulièrement adaptée.

L'exemple (figure 114) suivant montre la reconstruction d'une image à partir de sa décomposition. La reconstruction de l'image est faite avec trois degrés n différents. La courbe représente l'erreur résiduelle cumulée entre l'image originale et sa reconstruction en fonction du degré n .

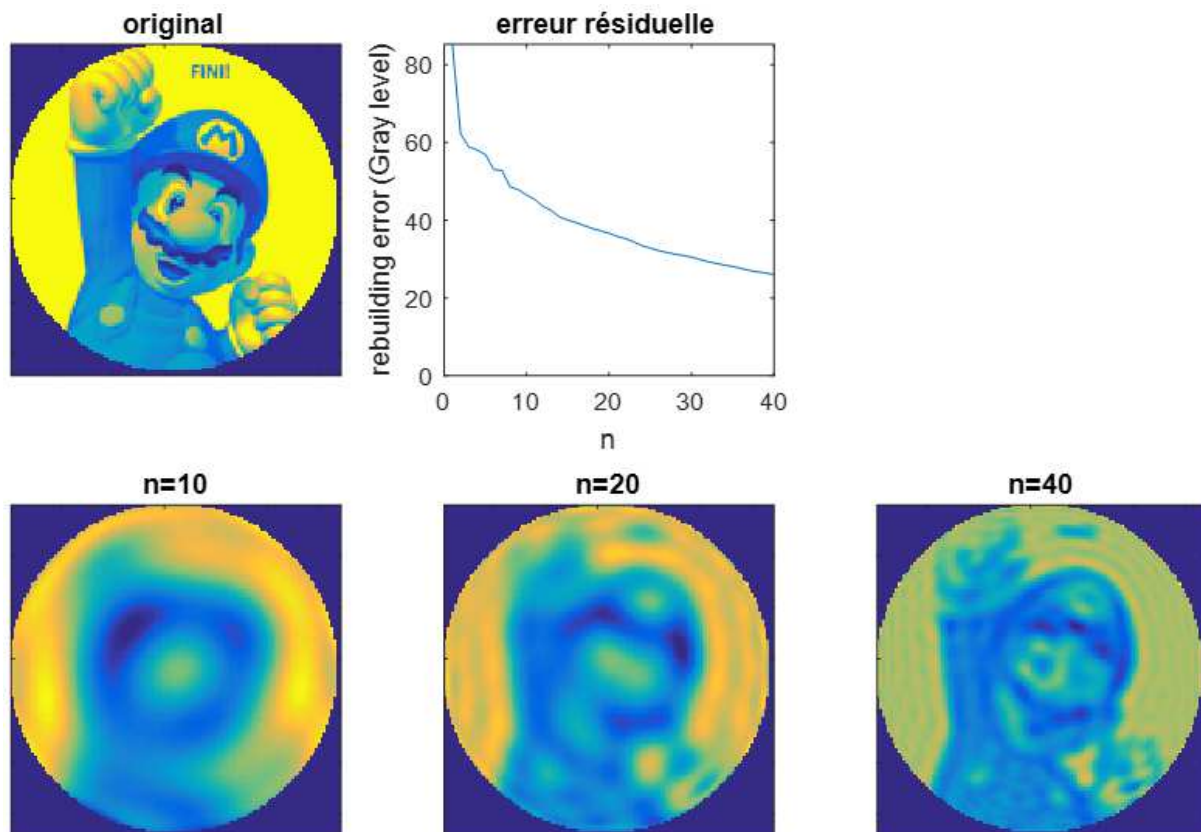


figure 114: Exemple de reconstruction d'image en utilisant la décomposition sur les polynômes de Zernike, en haut à gauche, l'image originale (crédit Nintendo), en bas, de gauche à droite, l'image reconstruite avec $n=10$, 20 et 40, en haut au centre, l'erreur résiduelle dans la reconstruction en fonction de n (crédit Nintendo®)

Les descripteurs de Zernike sont obtenus en utilisant le module des moment, $|A_{n,m}|$. Pour $n = 10$, $n = 20$ et $n = 40$, on obtient respectivement 36, 121 et 421 coefficients.

Une propriété remarquable est que les $|A_{n,m}|$ sont invariants par rotation. Le module des moments de Zernike pourra donc être utilisé comme un descripteur insensible à l'orientation de l'image d'origine.

Quand on travaille avec des images de petite taille, une limite des fonctions de Zernike tient à la discrétisation de l'espace image : pour les ordres n élevés, le nombre de pixels disponibles pour tracer les fonctions de Zernike est insuffisant et conduit à des erreurs de calculs liées au non-respect du théorème de Shannon ; Ces erreurs font que les fonctions ne sont alors plus orthogonales. Expérimentalement, la taille de nos images nous a limité à $n < 45$.

d. Méthodes de classification

Il existe de nombreuses méthodes de classification, reposant sur deux paradigmes bien distincts : les méthodes supervisées et non supervisées. Alors que les méthodes non supervisées ont pour but de partitionner un ensemble de données sans *a priori*, les méthodes supervisées fonctionnent à partir d'une connaissance *a priori* des classes auxquelles appartiennent un ensemble d'éléments. Dans la pratique, ces deux approches sont souvent complémentaires : une approche classique consistant à évaluer la séparabilité des classes à l'aide d'une méthode non supervisée puis à utiliser ce résultat obtenu pour choisir et paramétrer une méthode supervisée.

i. Méthodes de classification non supervisées (« clustering »)

L'idée d'une méthode de classification est de partitionner un ensemble, on parle généralement de « clustering ». Ce partitionnement peut être effectué en regroupant les éléments (méthodes ascendantes) ou bien en les séparant (méthodes descendantes) selon un ou des critères de « ressemblance » ou de « dissemblance ». Une méthode de classification va généralement chercher à maximiser les « ressemblances » à l'intérieur de chaque classe et au contraire, à maximiser les « dissemblances » entre les différentes classes.

Il existe plusieurs manières de définir la « ressemblance » entre les éléments à classifier, mais également entre les groupes d'éléments. Pour une application particulière, la définition de la « ressemblance » s'avère cruciale.

Dans le cas non supervisé, l'idée générale est que la méthode de classification « découvre » les données puis les regroupe ou les sépare grâce à une fonction permettant de calculer des similarités. Le résultat est un partitionnement des données dans n classes. Dans l'exemple présenté dans la figure 115, deux classes de pixels sont immédiatement identifiables et une classification non supervisée les séparera en deux classes distinctes :

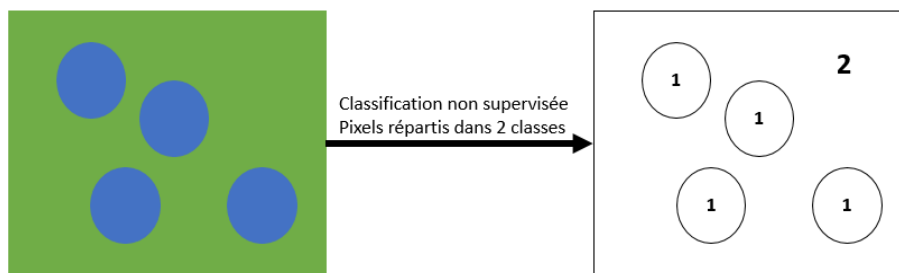


figure 115: Exemple de classification non supervisée, les pixels bleu sont attribués à la classe 1, les pixels vert, à la classe 2

Néanmoins, la même méthode de classification peut également donner le résultat suivant (figure 116) :

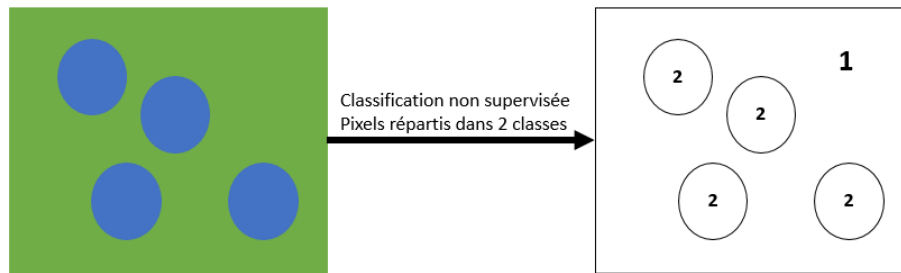


figure 116: Exemple de classification non supervisée, les pixels bleu sont attribués à la classe 2, les pixels vert, à la classe 1

Dans ces deux exemples, la classification non supervisée crée des groupes bien séparés (clusters) mais le clustering ne donne pas de sens sémantique (« vert » ou « bleu ») aux étiquettes « 1 » ou « 2 ». Il est alors nécessaire de faire appel *a posteriori* à l'expert. Cet exemple illustre une limitation importante des classifications non supervisées.

Les distances entre les éléments d'un ensemble

- La distance Euclidienne : c'est la définition la plus intuitive de la distance, elle est définie entre deux variables, de coordonnées respectives $\vec{X}^1 = (x_1^1, x_2^1, \dots, x_n^1)^T$ et $\vec{X}^2 = (x_1^2, x_2^2, \dots, x_n^2)^T$ et est donnée par

$$D(\vec{X}^1, \vec{X}^2) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i^1 - x_i^2)^2}$$

- La distance de Minkowski : [93] cette distance peut être vue comme une généralisation de la distance Euclidienne, elle est aussi appelée p-distance et est donnée par

$$D(\vec{X}^1, \vec{X}^2) = \sqrt[p]{\sum_{i=1}^n |x_i^1 - x_i^2|^p}$$

- La distance de Mahalanobis : La distance de Mahalanobis [94] prend en compte la covariance des variables de la série de données. Le but est d'accorder un poids moins important aux composantes bruitées. Cette distance est donnée par

$$D(\vec{X}^1, \vec{X}^2) = \sqrt{(\vec{X}^1 - \vec{X}^2)^T \Sigma^{-1} (\vec{X}^1 - \vec{X}^2)}$$

Avec Σ la matrice de covariance.

Dans le cas particulier où la matrice Σ est une matrice diagonale (variables indépendantes), cette distance est appelée distance Euclidienne normalisée et est donnée par

$$D(\vec{X}^1, \vec{X}^2) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i^1 - x_i^2)^2}{\sigma_i^2}}$$

Avec σ_i l'écart type de la variable x_i sur la série de données.

Dans le cas particulier où Σ est la matrice identité, $\sigma_i = 1 \forall i$, la distance de Mahalanobis est égale à la distance Euclidienne.

Les méthodes d'agrégation entre les ensembles

Il existe de nombreuses méthodes d'agrégation entre les ensembles [95] que nous ne détaillerons pas ici, nous présentons succinctement les deux méthodes les plus extrêmes (« Single » et « Complete ») qui se reposent sur un point en particulier de chaque ensemble, ainsi que la méthode de Ward qui prend en compte tous les points de chaque ensemble et semble être la plus usuelle :

- Les méthodes « single » et « complete » : ces deux méthodes sont très proches conceptuellement mais radicalement opposées dans la pratique. Avec la méthode « single », la distance entre deux classes est égale à la distance minimale entre un élément de la première classe et un élément de la seconde. Pour la méthode « complete », c'est au contraire la distance maximale entre un élément de la première classe et un de la seconde qui sera calculée.
- La méthode de Ward [96] : la distance de Ward est celle qui maximise l'inertie interclasse (équivalent à minimiser l'inertie intraclasse). Pour illustrer cette méthode, considérons X comme un ensemble d'individus dont le centre de gravité est noté G . L'inertie de X , en utilisant la distance d , est donnée par

$$I = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d^2(x_i, G)$$

Considérons maintenant que X est partitionné en k classes d'effectifs respectifs n_1, n_2, \dots, n_k et de centres de gravité g_1, g_2, \dots, g_k .

L'inertie interclasse sera donnée par :

$$I_{inter} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k n_i \cdot d^2(g_i, G)$$

L'inertie intraclasse sera donnée par :

$$I_{intra} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} d^2(x_j, g_i)$$

La figure 117 montre un exemple simple de regroupement de clusters avec la méthode de Ward. La somme des inerties inter et intra classe est égale à l'inertie totale du nuage de point, ce qui est conforme au théorème de Huygens [97]. Dans cet exemple, le regroupement D sera fait en utilisant la méthode de Ward.

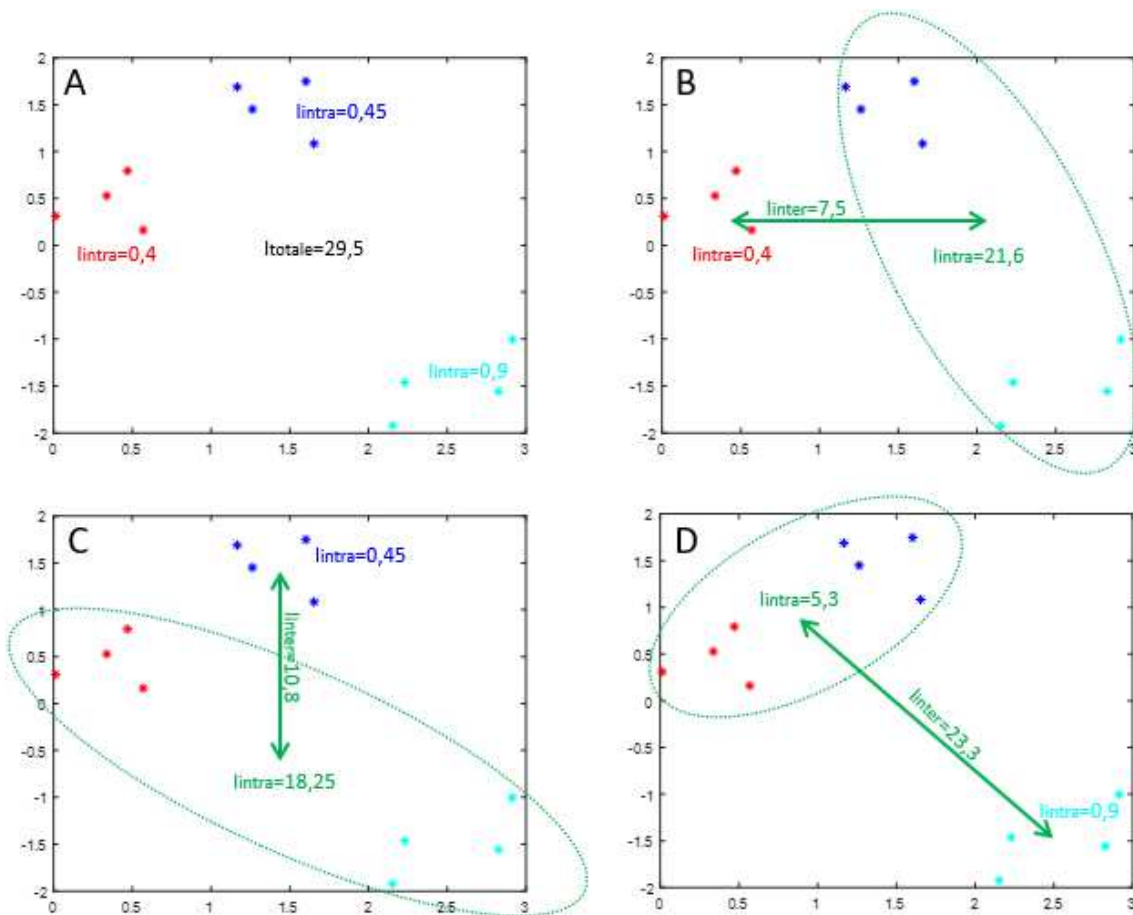


figure 117: exemple de regroupement de cluster avec la méthode de Ward. A) 3 clusters sont définis, leur inertie intra (I_{intra}) est précisée ainsi que l'inertie totale (I_{totale}) des 12 points.

B, C, D) l'inertie intra et inter classe (I_{inter}) est précisée en fonction du regroupement de cluster envisagé. Le regroupement donné par la méthode de Ward correspond à la figure D : ce regroupement minimise l'inertie intra classe et maximise l'inertie inter classe

Les différents algorithmes de clustering

Nous allons présenter succinctement les méthodes de classification non supervisées les plus usuelles et nous ferons une présentation plus détaillée de la méthode de classification ascendante hiérarchique que nous avons utilisée.

- Méthodes descendantes : Les méthodes descendantes cherchent à séparer l'ensemble d'origine en un nombre défini de classes. La méthode de base est la méthode des K moyennes qui a été par la suite améliorée et généralisée par les méthodes des nuées dynamiques et des K-médoïdes [98].
 - K-moyennes (K-means) : la méthode des K-moyennes est une méthode développée par J. MacQueen [53], [99]. C'est une approche descendante dont le principe est de déterminer itérativement les centres de gravité de k classes en minimisant les inerties intraclasse.
 - Nuées dynamiques : cette méthode, développée par E. Diday est une évolution de la méthode des K-moyennes [100]. Dans le but de stabiliser la convergence de l'algorithme, le changement proposé par E. Diday est de considérer un noyau d'individus représentatifs de chaque classe au lieu du centre de gravité de celles-ci.
 - K-médoïdes : il s'agit également d'une évolution de la méthode des K-moyennes proposée par L. Kaufman et P. Rousseeuw [101]. Pour cet algorithme, les classes sont représentées par un médoïde qui est défini comme leur représentant optimal. Cette méthode présente l'avantage d'être peu sensible aux individus hors norme.

Les méthodes descendantes nécessitent un *a priori* sur le nombre de classes, ce qui est un inconvénient majeur dans notre cas. Par ailleurs, ces méthodes ne garantissent pas la stabilité des classes lorsque le nombre demandé à l'algorithme change.

- Méthode ascendantes : ces méthodes partent des individus initiaux pour les regrouper. Ces méthodes n'ont pas d'*a priori* sur le nombre de classes présentes dans l'ensemble de départ. L'enjeu sera donc de « stopper » le regroupement au moment opportun pour qu'il reste pertinent.
 - Classification ascendante hiérarchique (CAH) [97]

L'idée générale d'une CAH est, à partir d'un ensemble, de créer une hiérarchie de sous-ensembles se contenant et ce, jusqu'au niveau de l'individu. La CAH est un processus utilisable

dès lors que l'on dispose d'une notion de distance définie entre les individus ainsi qu'entre les classes. Ce processus se décompose en quatre étapes :

- 1) Initialement, les classes sont les individus
- 2) On calcule les distances entre les classes (voir paragraphe précédent)
- 3) Les deux classes les plus proches sont fusionnées pour n'en former qu'une
- 4) On reprend la deuxième étape jusqu'à n'avoir plus qu'une seule classe

Le résultat d'une CAH se présente sous la forme d'un dendrogramme qui est un graphique présentant les individus et les distances d'agrégation entre les classes.

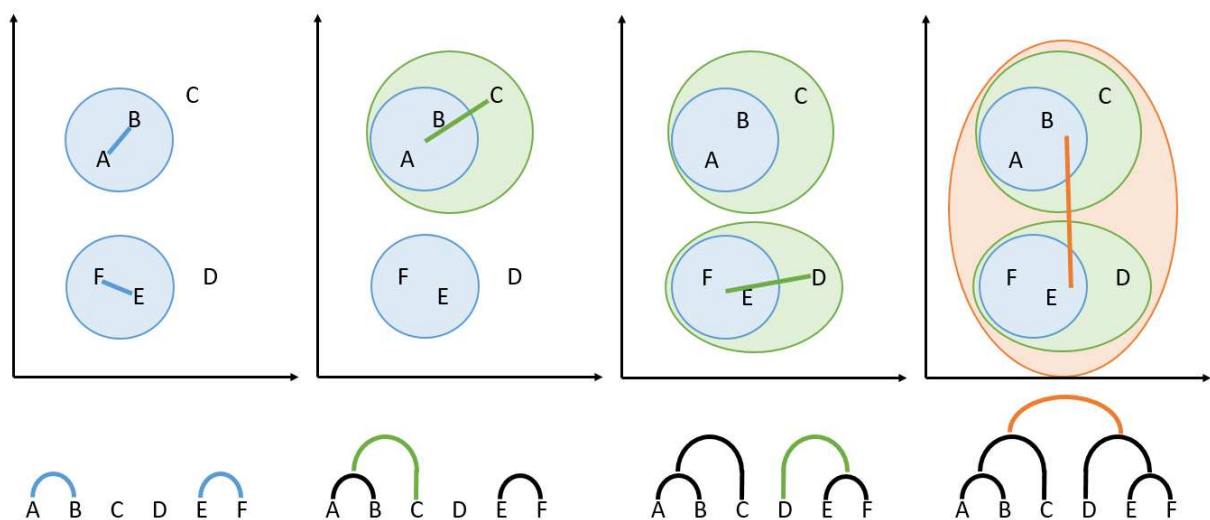


figure 118: exemple de regroupement de six éléments (A, B, C, D, E et F) en utilisant la CAH

Le processus de classification ascendante hiérarchique ne présuppose pas le nombre de partition optimal de l'ensemble de départ. Ce nombre de partition sera défini en « coupant » le dendrogramme, l'ensemble des éléments sous chaque nœud représentera alors l'ensemble des éléments de chaque partition ainsi définie. Le choix de la hauteur de coupure dans le dendrogramme est un choix critique puisqu'il détermine le nombre de partitions. Un critère usuel est de chercher une hauteur de coupure qui maximise l'inertie interclasse [98]. Dans la pratique, le choix de la distance interclasse utilisée est déterminant pour obtenir un résultat satisfaisant.

La figure 119 montre un ensemble d'individus répartis dans quatre classes, représentée chacune par une couleur (orange, bleu, jaune et violet). La figure 120 montre trois exemples de regroupements en fonction de la méthode d'agrégation des clusters utilisée (« Single », « Complete » ou « Ward »). Pour chaque regroupement, il a été choisi de couper le

dendrogramme de manière à obtenir quatre classes. Les branches correspondantes sont colorées pour chaque groupe ainsi défini. Pour chaque méthode, les individus sont figurés avec une couleur correspondant au groupe défini par la CAH. Dans cet exemple, on peut observer que la méthode de Ward permet d'obtenir un regroupement identique à l'original au numéro de classe près. Les méthodes « Single » et « Complete » donnent des groupes sans rapport avec ceux d'origine.

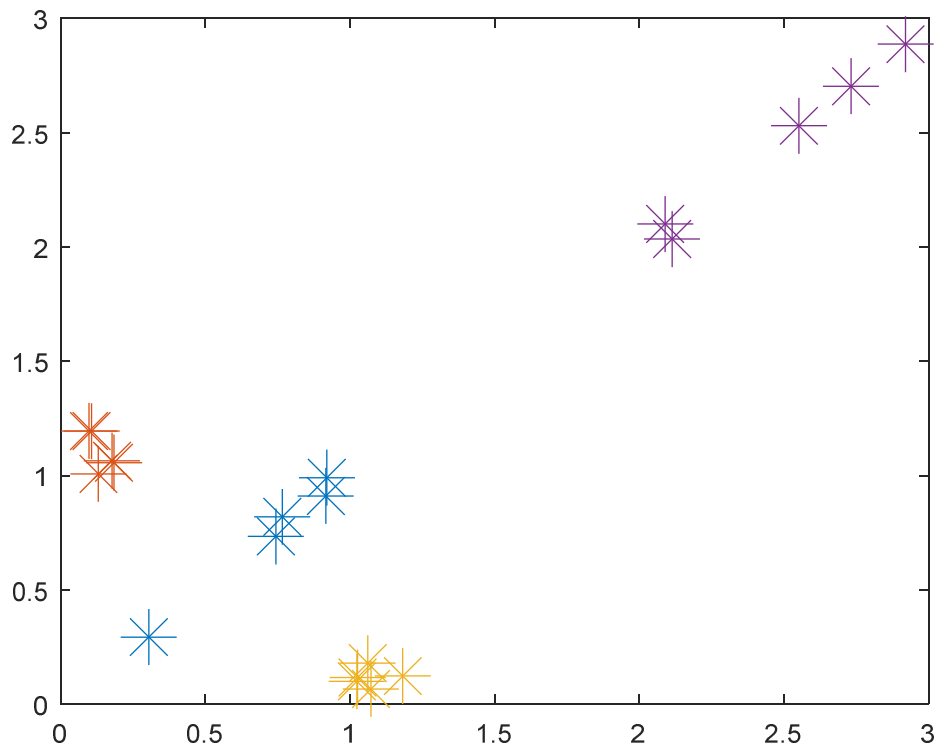


figure 119: Ensemble de points séparé en quatre groupes différenciés par leurs couleurs

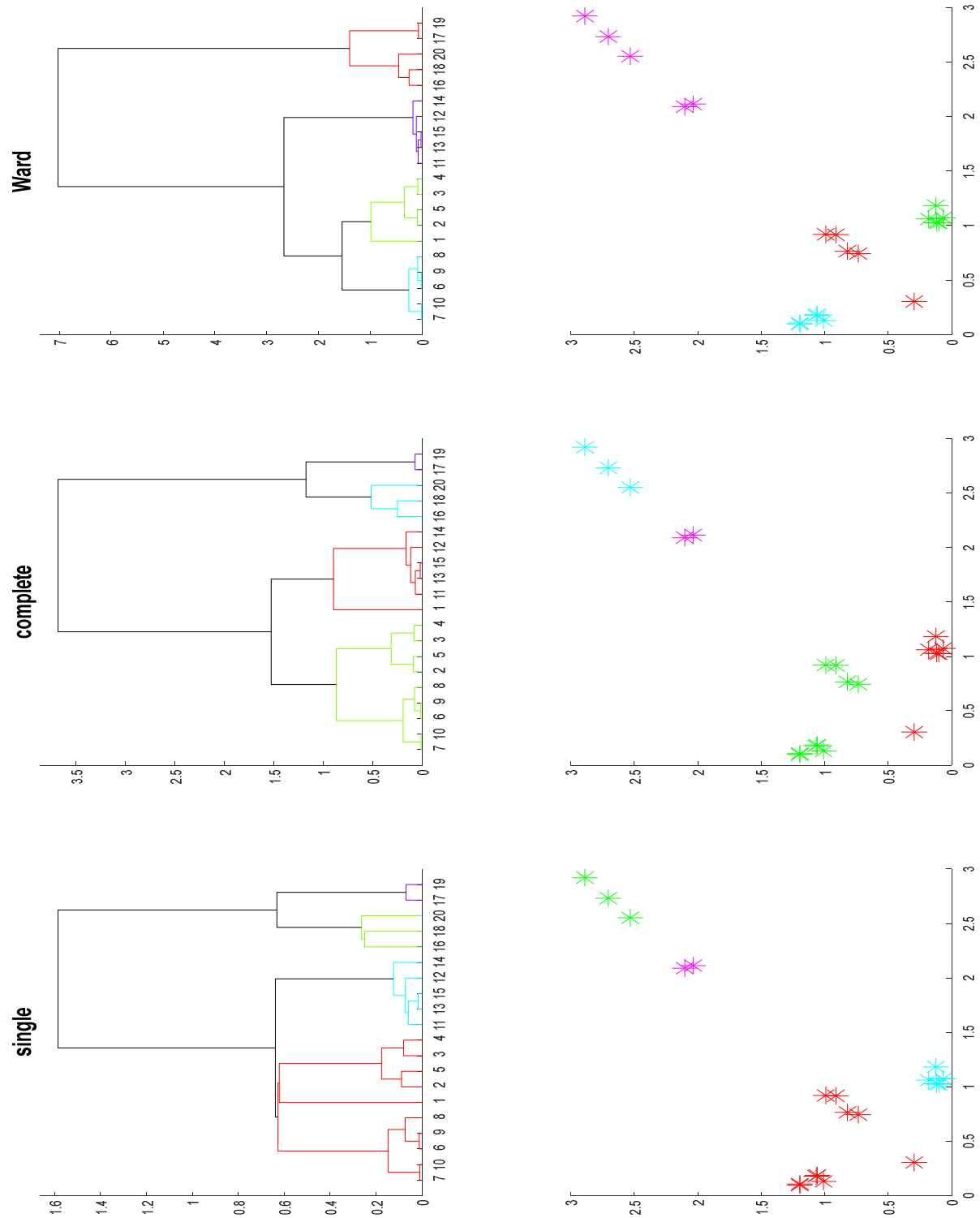


figure 120: Regroupements effectués par la CAH en fonction de la méthode d'agrégation choisie. De gauche à droite, le dendrogramme et la représentation graphique des groupes pour les méthodes de regroupement « Single », « Complete » et « Ward ». Dans cet exemple, seule la méthode de Ward donne quatre groupes identiques aux groupes d'origine.

ii. Méthodes de classification supervisées

Pour les méthodes supervisées, l'idée générale est, à partir d'un ensemble d'apprentissage dont le partitionnement en classes est connu, de définir un ensemble de règles permettant d'attribuer une étiquette (d'une classe connue) à chaque nouvel élément.

Une classification supervisée se décompose en deux phases :

- La phase d'apprentissage : l'ensemble d'apprentissage composés d'éléments étiquetés par des numéros de classes est utilisé pour définir un modèle. Soit $X^1 = \{x_1^1, x_2^1, \dots, x_n^1\}$ un ensemble d'éléments partitionné en k classes $C = \{c_1, c_2, \dots, c_k\}$, la phase d'apprentissage va consister en la détermination du modèle $\mathcal{M}_{X^1} = f(X^1, C)$.
- La phase de classification : les nouveaux éléments $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_m\}$ sont soumis au modèle conçu lors de la phase d'apprentissage et étiqueté dans une classe telle que $\mathcal{M}_{X^1}(Y) = \{c_{y_1}, c_{y_2}, \dots, c_{y_m}\}$ avec $c_{y_i} \in C$.

Nous présentons succinctement quelques méthodes de classification supervisées usuelles. Nous détaillerons l'analyse discriminante linéaire pour deux raisons : d'une part, les performances de l'analyse discriminante en classification se sont révélées similaires ou meilleures que les autres méthodes et d'autre part, l'analyse discriminante n'est pas qu'une méthode prédictive mais également une méthode descriptive, ce qui nous a été très utile pour la visualisation et l'interprétation des résultats. Ne disposant pas d'un assez large ensemble d'images, nous n'avons pas pu tester les méthodes très actuelles de « deep learning » [102].

- Arbres de décision[103] : le principe est de déterminer un ensemble de conditions (nœuds de l'arbre) permettant d'attribuer une classe (feuille) à chaque nouvel élément.
- Méthodes bayésiennes [98] : les méthodes de classification bayésiennes reposent sur le théorème de Bayes qui relie les probabilités conditionnelles de deux évènements.
- Réseaux de neurones [104] : L'approche par réseaux de neurones a pour principe de tenter de simuler un fonctionnement biologique. Le point clé est l'ajustement des poids pour chaque neurone lors de la phase d'apprentissage. Les méthodes les plus récentes repose sur l'apprentissage profond, le « Deep learning » [102]. Le point clé est alors l'extraction des paramètres de classification par les premières couches convolutionnelles. Cette complexification des réseaux rendue possible par la disponibilité de très larges ensembles d'apprentissage et d'une très grande capacité de calcul. La taille de nos échantillons ne nous a pas permis d'explorer cette voie.

- Support Vector Machine (SVM) [105] : l'idée originale des SVM est de sélectionner l'hyperplan de séparation optimal entre les classes.
- Analyse discriminante linéaire (LDA) [96] :

L'analyse discriminante peut être vue de deux manières différentes, elle peut en effet être descriptive, pour visualiser des données, ou prédictive, pour tenter d'attribuer une classe à une donnée inconnue.

Le principe d'une analyse discriminante linéaire est de trouver une fonction de projection W qui permette de séparer au mieux les moyennes projetées des classes de deux ensembles $X^1 = \{x_1^1, x_2^1, \dots, x_{n_1}^1\}$ et $X^2 = \{x_1^2, x_2^2, \dots, x_{n_2}^2\}$.

Cela revient à maximiser la fonction suivante

$$f(X^1, X^2) = W^T(m_2 - m_1)$$

Avec

$$m_k = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} x_k^i$$

Il n'y a pas de sens à ajuster la norme de W pour résoudre ce problème d'optimisation et elle sera donc fixée, égale à 1

$$\|W\| = 1$$

Cette seule contrainte n'est pas suffisante pour donner un résultat satisfaisant. L'analyse discriminante va donc également chercher à minimiser la variance intraclasse projetée exprimée par l'équation suivante, pour la classe 1 dont les éléments sont l'ensemble X^1 :

$$\sigma_1^2 = \sum_{i=1}^{n_1} (W^T x_i^1 - W^T m_1)^2$$

La solution de ce problème de minimisation est donnée par :

$$W = \frac{S_W^{-1}(m_2 - m_1)}{\|W\|}$$

Avec

$$S_W = \sum_{i=1}^{n_1} (x_i^1 - m_1)(x_i^1 - m_1)^T + \sum_{i=1}^{n_2} (x_i^2 - m_2)(x_i^2 - m_2)^T$$

Une fois le vecteur W calculé, il faut déterminer la valeur discriminante w_0 permettant d'étiqueter un élément inconnu y dans une classe. C'est-à-dire la valeur w_0 telle que, si $W^T y \geq w_0$ alors y sera étiqueté dans la classe 1, et étiqueté dans la classe 2 sinon. Dans

la pratique, cette valeur est prise comme la moyenne des moyennes, autrement dit, le point à mi-chemin entre les moyennes des deux classes :

$$w_0 = \frac{W^T m_1 + W^T m_2}{2}$$

L'analyse discriminante permet donc une utilisation descriptive en permettant de visualiser à l'aide de la projection W mais également une utilisation prédictive grâce à w_0 , ne permettant d'attribuer une étiquette à un nouvel élément. La figure 121 montre un exemple d'analyse discriminante entre deux ensembles d'éléments classés en deux classes (rouge et bleu).

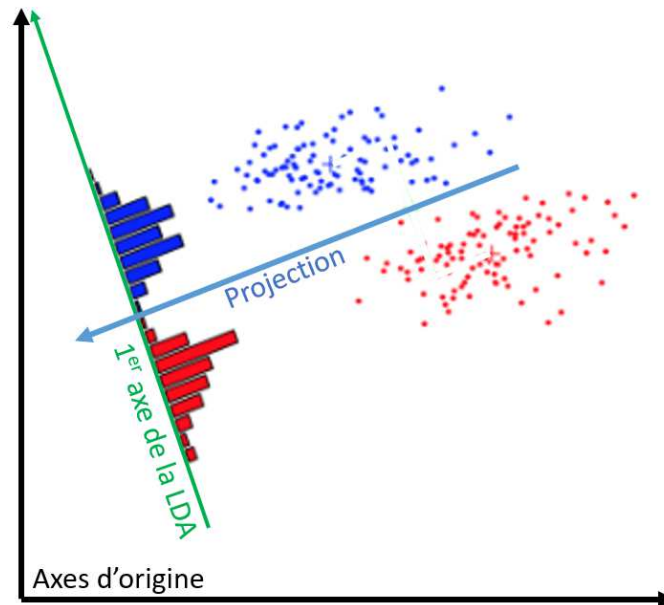


figure 121: exemple d'analyse discriminante linéaire (Source : Hugo Larochelle²⁸)

L'analyse discriminante se généralise pour N classes. Dans ce cas, il s'agit de déterminer un ensemble de $N - 1$ axes discriminants sur lesquels seront projetés les points. L'idée est de maximiser la variance interclasse (S_b) et de minimiser la variance intraclasse (S_W).

$$S_W = \sum_{j=1}^k \sum_{x_i^j \in X^i} n_j (x_i^j - m_j)(x_i^j - m_j)^T$$

$$S_b = \sum_{j=1}^k n_j (m_j - m)(m_j - m)^T$$

²⁸ <https://www.youtube.com/watch?v=s4e6xsPboDo>

La matrice de projection W satisfaisant à ces deux contraintes est donnée par

$$S_b W = S_w W L$$

Avec L la matrice diagonale des valeurs propres.

Un point est classé dans la classe C si la projection du centre de gravité de la classe C est la plus proche de la projection du point au sens de la distance de Mahalanobis.

iii. Evaluation de la qualité d'une classification

Il est important de valider le résultat d'une classification et à cette fin, de nombreux outils d'évaluation de qualité ont été développés [106]. Dans cette section, seuls les outils que nous avons utilisés seront développés.

Il existe deux approches :

- Interne : cette approche propose d'évaluer la qualité d'une classification en évaluant des critères statistiques décrivant la forme des ensembles formés par la classification.
- Externe : cette approche repose sur une connaissance à priori de la classe de certains éléments soumis au modèle de classification.

L'approche interne repose sur des notions telles que l'homogénéité des partitions ou leur inertie. Ces méthodes sont très bien adaptées dans le cadre de classification non supervisées car, par essence, les classes des éléments ne sont pas supposées connues à priori.

L'approche externe est celle que nous avons retenue afin de pouvoir estimer la performance des modèles en rapport avec les vérités de terrain et avec les comptages manuels effectués. Avec ce type d'approche, le résultat du classement d'un élément par un modèle de classification peut être :

- **Vrai positif** : La classe désignée par le modèle pour l'élément est la même que la classe attendue, ce cas représente un succès.
- **Vrai négatif** : En considérant une classe et un élément ne lui appartenant pas, un modèle attribuant une classe différente génère un vrai négatif.
- **Faux positif** : Un faux positif est un élément placé à tort dans une classe par le modèle.
- **Faux négatif** : Un faux négatif est un élément placé à tort dans une classe différente de la classe attendue.

Les proportions d'éléments classés dans chacune de ces quatre catégories sont alors utilisées pour évaluer la performance de la classification. Dans nos travaux, nous avons utilisé ces deux méthodes :

- F-mesure : [107] La F-mesure permet d'attribuer un score à la qualité d'une classification, allant de 0 pour une classification totalement erronée à 1 pour une classification parfaite. Nous avons choisi d'utiliser la F-mesure pour évaluer la qualité de détection des cercles (chapitre 3) car elle prend en compte les succès autant que les échecs pour évaluer très finement la qualité de la détection.

Elle est définie par l'équation

$$F = 2 \frac{p \cdot r}{p + r}$$

Avec p et r désignant respectivement la précision et le rappel, définit par

$$p = \frac{vp}{vp + fp}$$
$$r = \frac{vp}{vp + fn}$$

Où vp , fp , fn , représentent respectivement les nombres de vrais positifs, faux positifs et faux négatifs.

- Fonction d'efficacité du récepteur ou courbes ROC (« Receiver Operating Characteristic ») : [108] : Le principe d'une courbe ROC est de donner le taux de vrais positifs en fonction du taux de faux positifs. Chaque point de la courbe est obtenu en faisant varier le seuil décisionnel du modèle de classification depuis sa plus petite valeur, pour laquelle le modèle donne un résultat positif quel que soit l'élément (point [1,1]), à sa plus grande valeur, pour laquelle le modèle donne un résultat négatif quel que soit l'élément (point [0,0]).

Nous avons choisi d'utiliser les courbes ROC car elles nous permettent de comparer les performances des différentes méthodes de classification. C'est cette mesure de performance qui nous permettra de faire le choix de l'analyse discriminante linéaire comme méthode de référence.

La figure 122 montre un exemple de courbe ROC. L'aire sous la courbe (AUC, pour « Area Under the Curve ») définit la qualité de la classification. Plus l'AUC est élevée, plus le modèle de classification est efficace. Une aire égale à 1 caractérise un modèle ne faisant pas d'erreur. L'AUC minimum est 0.5 et caractérise un modèle donnant un résultat aléatoire.

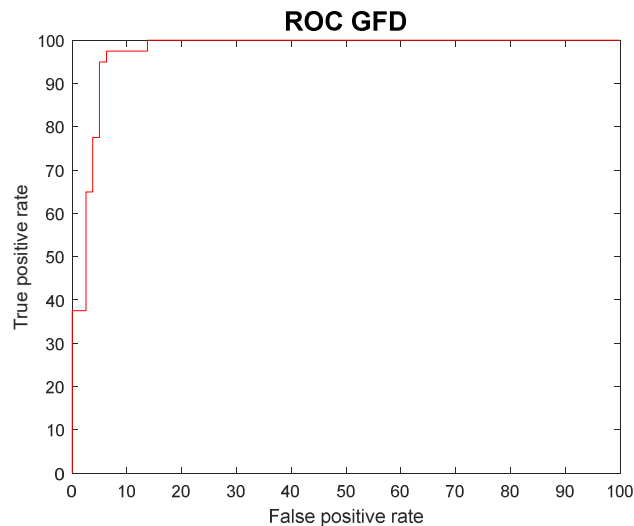


figure 122: exemple de courbe ROC ("receiver Operating Characteristic")

3. Application à l'étude des agrégats ribo nucléoprotéiques

L'expérience menée par le Dr Stéphane Guyot au sein du laboratoire PAM a consisté à soumettre une souche mutante de *saccharomyces cerevisiae* à plusieurs types de stress thermiques [109]. Lorsque les cellules sont soumises à un stress, on observe la formation d'agrégats ribo nucléoprotéiques. Ces agrégats sont observables grâce à l'utilisation d'une souche mutante produisant une protéine fluorescente visible en utilisant un microscope bi photon.

Le matériel utilisé pour l'obtention des images, un microscope Nikon® A1-MP équipé d'un objectif apochromatique (x60), ne fournit pas les images en transmission qui nous auraient permis de segmenter facilement les cellules en utilisant les méthodes présentées dans le deuxième chapitre. Nous disposons donc uniquement des images en fluorescence. Le problème s'est donc scindé en deux cas :

- Cas 1 : En présence de fluorescence diffuse (figure 123). Dans ce premier cas, qui sera le plus largement développé, la fluorescence diffuse permet d'identifier clairement les cellules par segmentation. L'absence des images en transmission n'a donc pas été un problème. La problématique dans ce cas a été l'estimation du nombre d'agrégats.

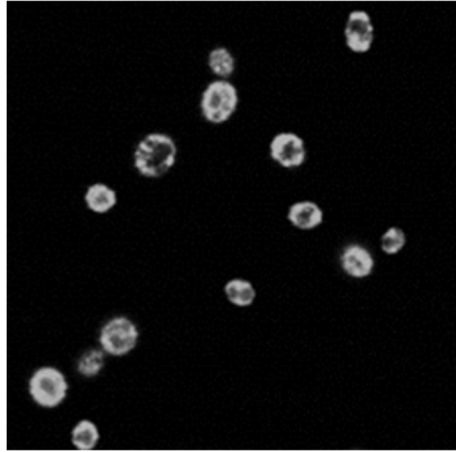


figure 123: exemple d'image avec une fluorescence diffuse suffisante pour segmenter les cellules

- Cas n°2 : Absence de fluorescence diffuse ou fluorescence diffuse trop faible (figure 124). Dans ce second cas, l'identification des cellules par segmentation n'est pas possible. En contrepartie, l'identification des agrégats a été largement simplifiée. Bien qu'il existe des microscopes permettant de disposer des images en transmission et fluorescence en simultané, ces derniers sont malheureusement d'un coût prohibitif. Nous proposons donc une approche permettant de reconstruire les cellules à partir des agrégats.

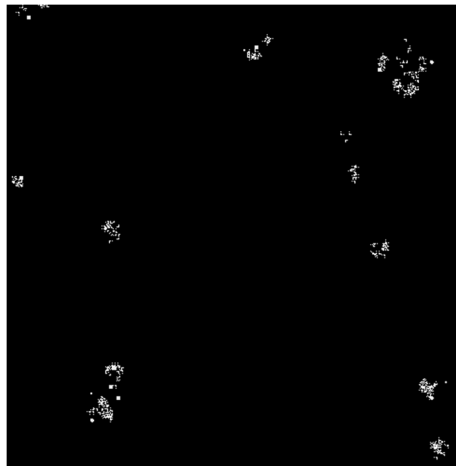


figure 124: exemple d'image avec très peu, voire pas, de fluorescence diffuse, la luminosité de l'image est poussée au maximum pour des raisons de visibilité

a. Cas n°1 : présence de fluorescence diffuse

L'objectif est d'obtenir une vision statistique du développement des agrégats pour chaque image. Autrement dit, il s'agit de procéder à une observation en masse mais individualisée de chaque cellule présente dans les cultures. L'enjeu étant d'obtenir une observation non biaisée

du développement des agrégats afin de pouvoir étudier les relations entre le développement des agrégats et les taux de survie. Il est impossible d'obtenir cette observation statistique manuellement pour deux raisons principales :

- Le nombre très élevé de cellules : avec un nombre d'image relativement limité (210), nous avons obtenu environ 5000 cellules observables. Effectuer ces 5000 observations manuellement est un travail long et répétitif. La durée combinée à la répétitivité est un facteur d'erreur très important (lassitude, baisse de concentration). Qui plus est, un travail long nécessite la présence du ou des experts pour le réaliser représente donc un coût important.
- La subjectivité de l'expert : nous avons montré que, même avec des critères communs pour le comptage des agrégats, les résultats sont extrêmement variables d'un expert à l'autre.

La grande variabilité des comptage manuels est un problème majeur dans la mesure où l'obtention d'une vérité de terrain claire s'est révélée être impossible. En effet, nous avons sélectionné au hasard 240 imagettes de cellules puis demandé à treize collaborateurs de réaliser un comptage du nombre d'agrégats pour chacune d'entre elles (le formulaire de comptage que nous leur avons soumis est produit en annexe 3). La figure 126 présente les résultats obtenus par les compteurs, projetés sur les deux premiers axes de l'ACP (centrée, réduite), chaque point représente la synthèse des 240 comptages pour un de nos collaborateurs. Nous avons tracé en rouge l'ellipse de confiance à 90%. Cette projection met en évidence l'absence de consensus clair dans les comptages du fait de l'étalement des points mais également la subjectivité des comptages dans la mesure où certains points sortent de l'ellipse de confiance. La figure 125 présente un exemple de cellule pour laquelle les résultats sont particulièrement variables. Les comptages réalisés donnent des valeurs comprises entre 3 et 12 (moyenne 7.6).

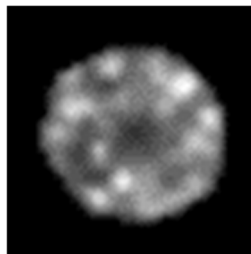


figure 125: exemple de cellule avec agrégats ribo nucléoprotéiques

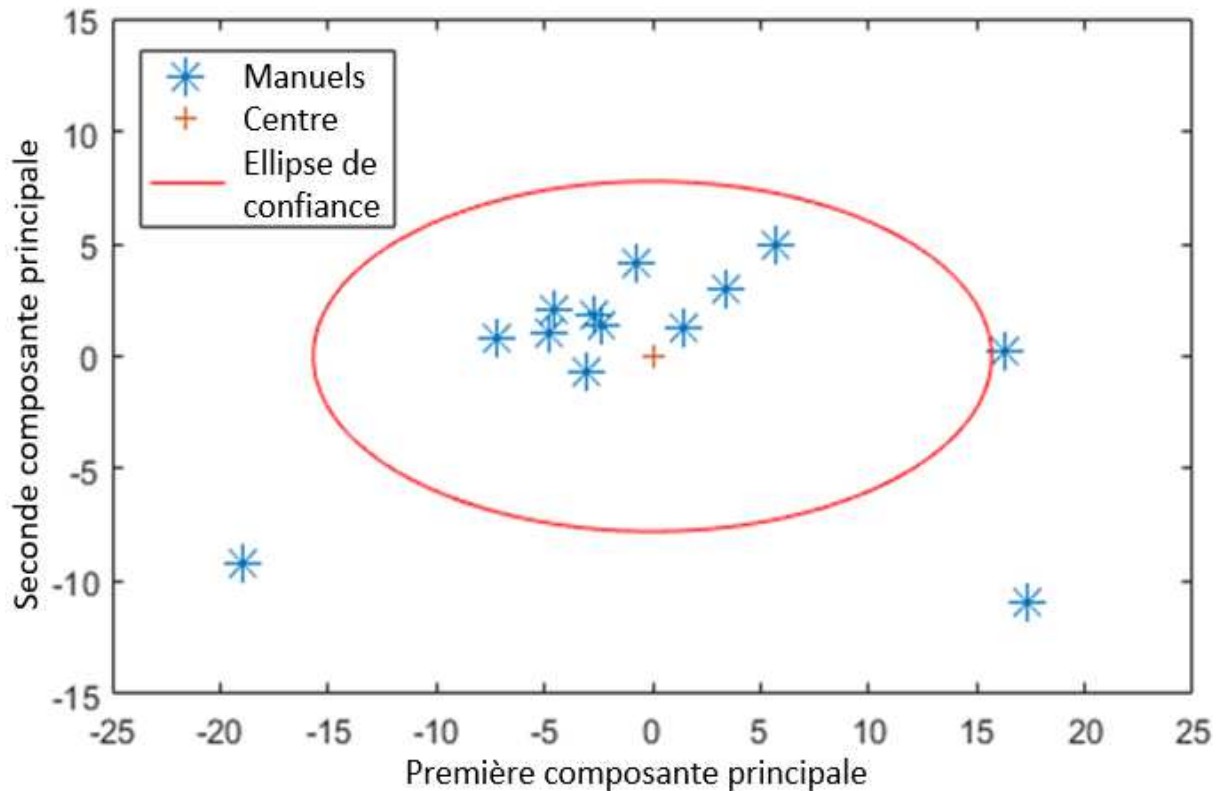


figure 126: projection des 13 comptages manuels d'agrégats réalisés pour 240 cellules

i. Stratégie d'estimation du nombre de RNPs

Ayant proposé des méthodes de comptage cellulaire dans le chapitre précédent, il a semblé naturel de les utiliser pour compter les agrégats. La forme des agrégats ne permet *a priori* pas l'utilisation des méthodes basées sur les gradients car rien ne garantit qu'ils soient circulaires ou pseudo-circulaires. Dans les faits, nous avons constaté que les agrégats ont une structure régulière, quasi circulaire. Nous avons testé les méthodes basées sur les gradients. Malheureusement, l'utilisation de notre approche ne donne pas des résultats satisfaisants. Dans le meilleur des cas, nous arrivons à détecter les agrégats mais également une quantité non négligeable de faux positifs. Par ailleurs, il a été nécessaire de réaliser un réglage spécifique pour chaque cellule. En effet, la taille des agrégats (quelques pixels) est trop faible pour permettre une détermination correcte des gradients. La figure 127 montre trois exemples de détection pour des cellules contenant différents nombres d'agrégats et en optimisant manuellement les paramètres pour chacune d'entre elles. Dans cette figure, chaque étoile colorée indique la détection d'un agrégat.

La méthode de détection de forme pseudo circulaires n'est donc pas applicable à la problématique des agrégats, il est donc nécessaire de proposer des méthodes d'observation spécifiques.

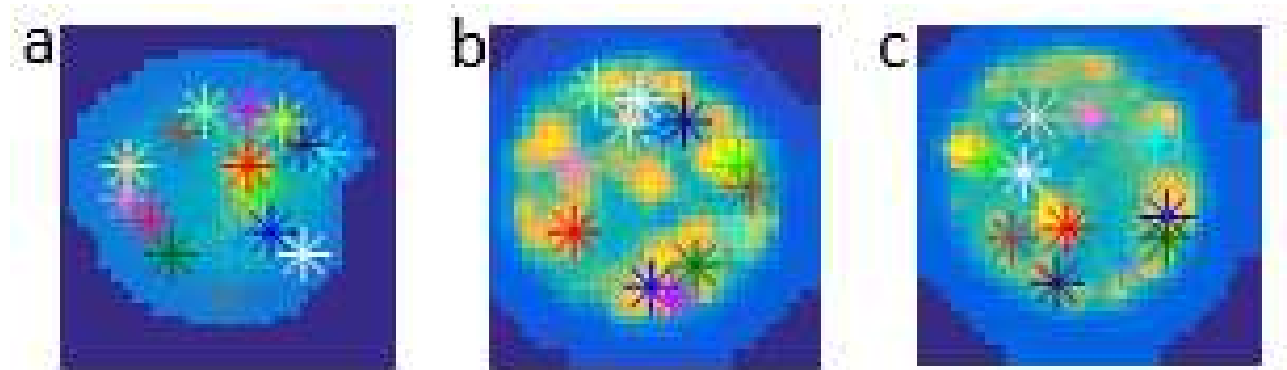


figure 127: Exemple de détection d'agrégats à l'aide de la transformée de Hough par gradient. Pour les cellules a, b et c, les étoiles indiquent les agrégats détectés

Parallèlement à cette première expérience, nous avons soumis un jeu d'images de cellules individuelles à un ensemble de 13 compteurs. Le résultat obtenu présente une forte variabilité, le décompte manuel pouvant varier de trois à 12 dans certains cas (voir figure 126 et figure 125). Très peu d'images de cellules ont abouti à un consensus clair pour le nombre d'agrégats présents. Un problème important est donc apparu lorsqu'il a fallu définir ce qu'est un comptage correct, autrement dit, la vérité de terrain. Il est même apparu que la seule détermination de présence/absence d'agrégats pouvait parfois poser un problème lors d'une observation manuelle.

Ces résultats nous ont conduit à chercher une méthode à même de détecter la présence ou l'absence, puis d'estimer le nombre d'agrégats par une approche plus indirecte qu'un comptage effectif. En se basant sur l'hypothèse que l'augmentation du nombre d'agrégats donne un aspect plus « granuleux » à la cellule, nous nous sommes orienté vers une approche texturale. L'objectif étant de caractériser cette perception de granulosité en relation avec le nombre d'agrégats. Nous avons extrait des paramètres texturaux pour nos imagerie de cellules et ensuite procédé à une classification de celles-ci afin d'estimer le nombre de RNPs.

Nous avons alors décomposé l'expérience en quatre étapes :

- 1) Segmentation des cellules sur la base de la fluorescence diffuse : cette première étape nous permet d'extraire les cellules dans des imagerie individuelles.
- 2) Discrimination des cellules en fonction de la présence ou de l'absence d'agrégats. Bien qu'il soit impossible de déterminer manuellement le nombre de RNPs, il est possible de séparer manuellement les cellules avec et sans RNPs. Nous avons donc sélectionné un ensemble de cellules (S0) pour valider la possibilité de discriminer les cellules selon ces critères à l'aide de paramètres texturaux.
- 3) Etude sur la possibilité de discriminer le nombre d'agrégats à l'aide d'une vérité de terrain. Dans l'impossibilité de déterminer une vérité de terrain claire, nous avons créé un ensemble d'imagerie de cellules synthétiques contenant chacune un nombre précis d'agrégats (S1). Nous avons utilisé cette ensemble afin d'évaluer la capacité des paramètres texturaux à discriminer le nombre d'agrégat présents dans un cas idéal.
- 4) Application au cas réel et confrontation aux résultats manuels. Nous avons sélectionné deux ensembles d'imagerie, S2 et S3. Le premier ensemble (S2) constitue notre vérité de terrain, autrement dit, notre *a priori* pour l'ensemble des estimations. Le deuxième ensemble (S3) est celui soumis aux 13 experts, il nous servira de référence pour évaluer la performance de notre estimation.

La figure 128 présente de manière synthétique la stratégie de traitement que nous allons suivre pour estimer le nombre de RNPs dans le cas de présence de fluorescence diffuse.

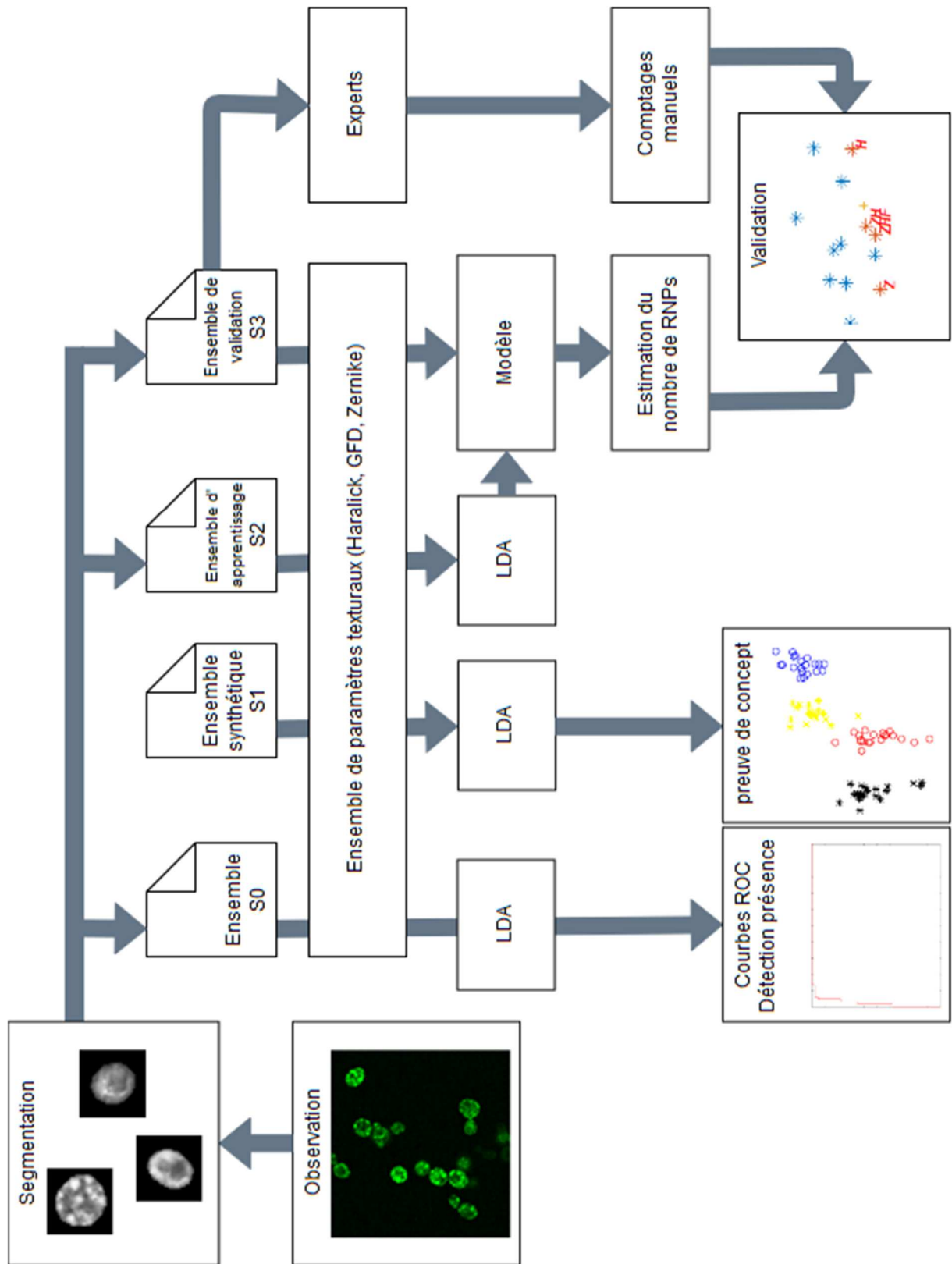


figure 128: Stratégie de traitement dans le cas de présence de fluorescence diffuse

ii. Segmentation des cellules

La première étape consiste à segmenter les cellules. Compte tenu de la taille des images (512x512 pixels) et de la taille des cellules, nous avons fixé une taille de 31x31 pixels pour l'imagette de chaque cellule segmentée. Cette segmentation se décompose en quatre étapes :

- Le traitement du bruit dans l'image en utilisant un filtre de Kovesi [54], déjà utilisé dans les chapitres précédents (page 66).
- Le seuillage : L'utilisation de fluorescence pour l'acquisition des images nous permet de procéder à la segmentation des cellules en utilisant un seuillage. Nous avons utilisé la technique d'Otsu [110] qui nous permet de séparer proprement les zones comportant des cellules du fond de l'image.
- Traitement des amas : le seuillage donne en résultat des clusters de pixels pouvant correspondre à une cellule unique ou à un ensemble de cellules regroupées dans un amas. La forme des amas nous a orienté vers l'utilisation de la ligne de partage des eaux (« watershed ») [111] (voir figure 129), particulièrement bien adaptée pour les séparer en cellules individuelles.
- Sélection des cellules : des critères de forme et de taille sont utilisés afin de ne conserver que les cellules exploitables.

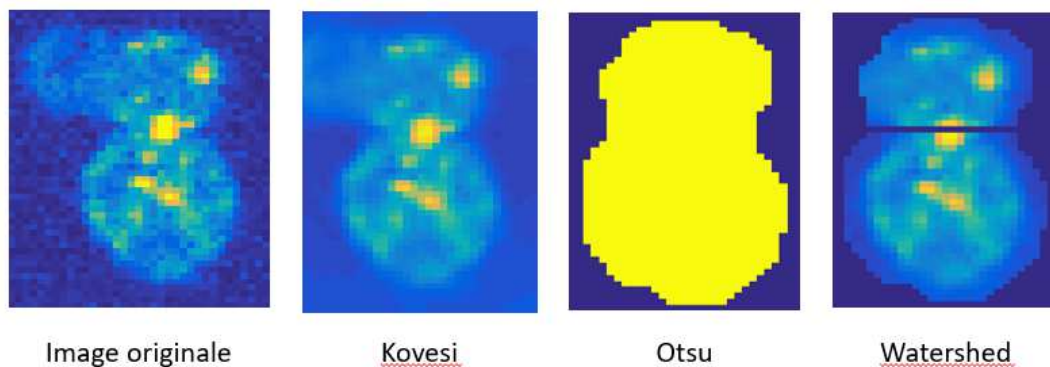


figure 129: Exemple de segmentation, zoom sur un amas de cellule. De gauche à droite: l'image originale, l'image traitée par le filtre de Kovesi, l'image seuillée avec la méthode de Otsu, deux cellules identifiées après l'application de la méthode de ligne de partage des eaux (watershed)

Pour chaque image, l'objectif a été de sélectionner un maximum de cellules exploitables, c'est-à-dire :

- Des cellules représentant assez de pixels pour permettre un calcul non dégénéré des paramètres de texture retenus. Le critère de rejet retenu correspond aux cellules comportant moins de pixels qu'un disque de seize pixels de diamètre (~200 pixels).
- Des cellules présentant une forme régulière, quasi circulaire. Nous avons rejeté toutes les cellules dont une partie est coupée par le bord de l'image. Sur la forme des cellules, nous avons défini un critère de solidité²⁹ par la proportion de pixels appartenant à la fois à l'enveloppe convexe et à la surface. Ce critère est égal à 1 pour une surface convexe et diminue avec l'apparition de zones concaves caractéristique de l'apparition d'irrégularités dans le contour. Nous avons également utilisé le critère d'excentricité défini par le rapport entre la distance séparant les foyers et la longueur de l'axe principal de l'ellipse possédant le même moment d'inertie que la cellule. L'excentricité varie de 0 à 1 : une forme parfaitement circulaire est représentée par 0 et un segment, par 1. Pour le critère de solidité, nous avons positionné arbitrairement le seuil à 0.96 et pour le critère d'excentricité, ce seuil a été positionné à 0.7.

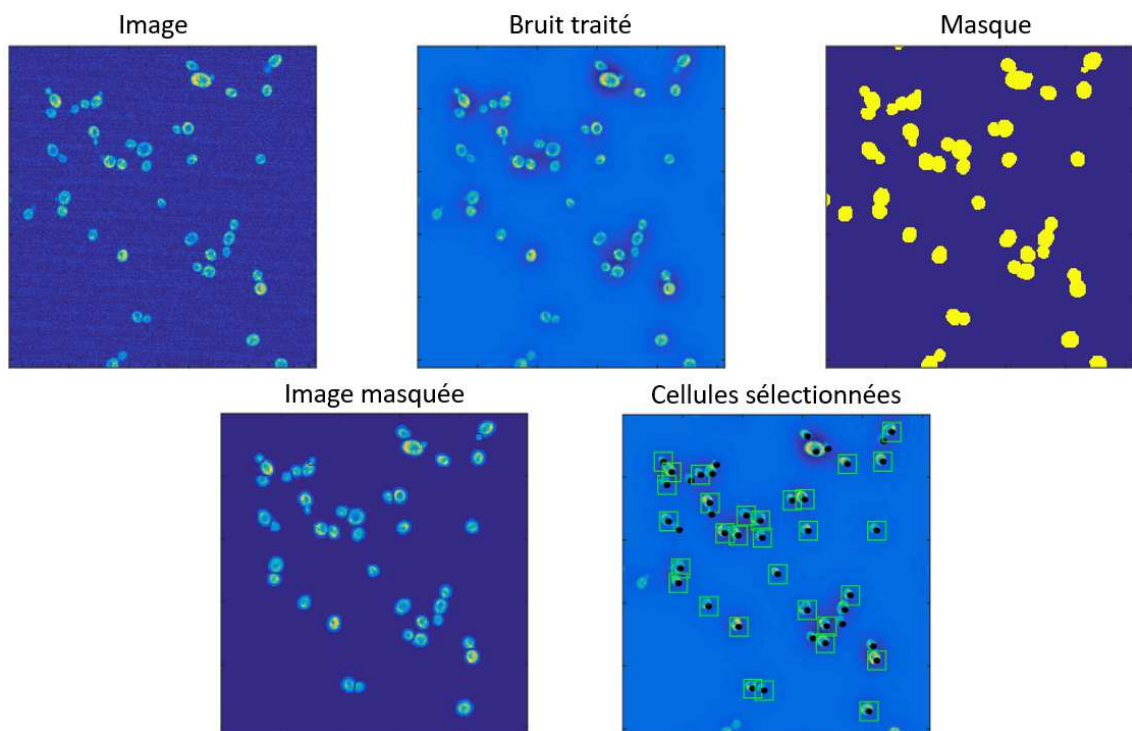


figure 130: processus de segmentation des cellules, de gauche à droite et de haut en bas: l'image originale, l'image traitée avec le filtre de Kovesi, le masque obtenu avec la méthode d'Otsu, l'image débruitée après masquage et application de la méthode de ligne de partage des eaux, les cellules retenues (carrés vert)

²⁹ <https://fr.mathworks.com/help/images/ref/regionprops.html>

iii. Ensembles de cellules de références

Notre stratégie de traitement fait appel à des méthodes de classification et nous avons donc eu besoin de disposer d'ensemble d'images de cellules adaptées pour chaque objectif, nous en avons défini quatre (figure 131) :

- **S0** : Pour la discrimination entre les cellules présentant ou non des agrégats. Nous avons déterminé un ensemble constitué de 120 cellules. Cet ensemble se décompose en
 - 40 cellules dont il est clair qu'elles n'ont développé aucun agrégat
 - 40 cellules pour lesquelles la présence d'agrégat(s) est claire et indiscutable
 - 40 cellules pour lesquelles la présence ou non d'agrégat pose question
- **S1** : Afin de valider la possibilité d'estimer le nombre d'agrégats et compte tenu de l'impossibilité d'obtenir une vérité de terrain, nous avons créé un modèle simple de cellule synthétique nous permettant de générer un ensemble d'apprentissage. Les cellules comportent de zéro à sept agrégats disposés aléatoirement. Nous avons limité le nombre d'agrégats à sept car parmi les images dont nous disposons, peu présentent un nombre important d'agrégats (>7). Il s'avère également qu'au-delà de sept agrégats, il est difficile d'obtenir un consensus dans les comptages manuels (voir exemple donné en figure 125).

Pour l'application au cas réel, nous avons défini deux ensembles :

- **S2** : cet ensemble est constitué de 181 cellules réparties en huit classes : sept représentant un nombre d'agrégats de zéro à six et une représentant les cellules avec sept agrégats ou plus. Ces 181 cellules ont été choisies car elles font consensus pour le nombre d'agrégat présents. Il faut garder en mémoire que cet ensemble, qui servira pour les phases d'apprentissage, définit *l'a priori* de l'expert et, par conséquent, influe directement sur la qualité des résultats obtenus.
- **S3** : cet ensemble représente 240 cellules qui ont été soumises à 13 collaborateurs. Les résultats obtenus lors de ces comptages manuels représentent la référence à laquelle il conviendra de comparer les résultats obtenus par les méthodes proposées.

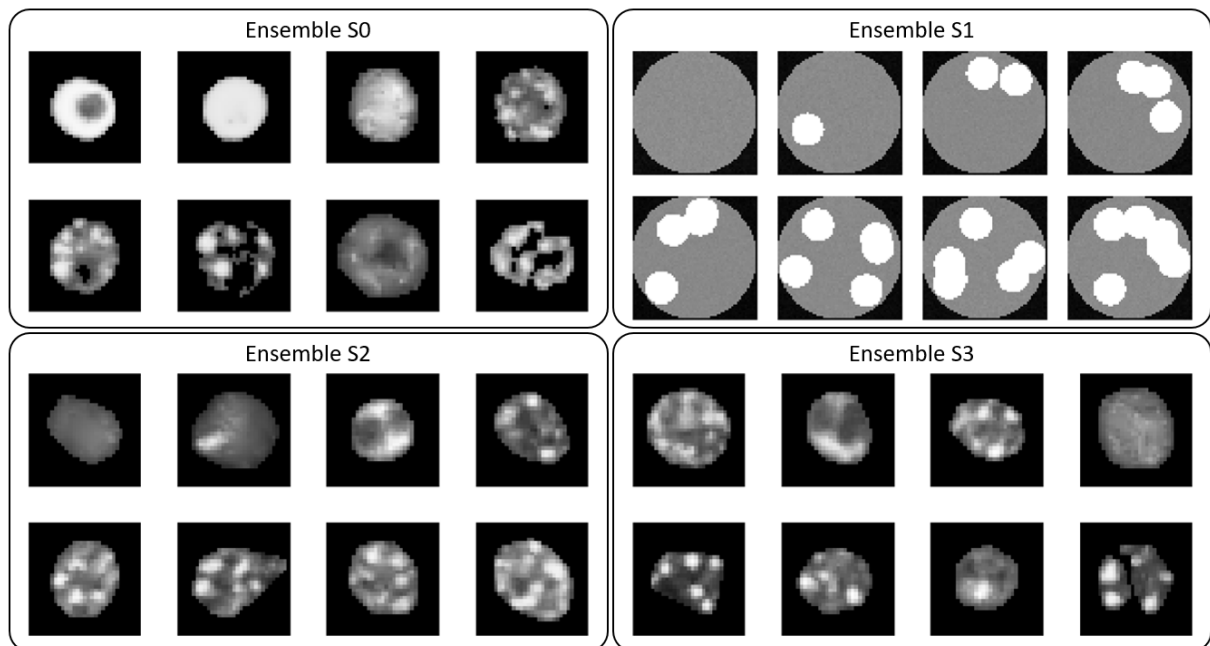


figure 131: exemple d'imagettes pour chaque ensemble

iv. Etude de la discrimination des cellules avec et sans agrégats

L'objectif est ici d'étudier la possibilité de détecter les agrégats à l'aide de l'approche texturale. Sans perdre de vue l'objectif d'évaluer le nombre d'agrégats, il s'agit ici d'une simplification du problème initial dans le but d'évaluer la pertinence de l'approche texturale. Cette simplification se fait sur deux axes :

- Nous avons vu précédemment la complexité, voire l'impossibilité, d'obtenir une vérité de terrain concernant le nombre d'agrégats. Néanmoins, il a été possible de déterminer humainement, sans aucun doute possible, un ensemble ne présentant pas d'agrégat et un autre avec. Nous disposons donc ainsi d'une vérité de terrain indiscutable. Afin de tester le pouvoir discriminant des paramètres texturaux choisis, nous avons ajouté un ensemble de cellules pour lesquelles la présence d'agrégat n'était pas clairement tranchée.
- Nous limitons le problème à trois classes, ce qui facilite la visualisation et l'interprétation des résultats. Cela nous permet également d'utiliser plus simplement les courbes ROC pour évaluer la performance. Pour ce faire, nous opposerons la classe « sans agrégats » aux deux autres.

Pour l'ensemble S0 de 120 imagettes de cellules. Nous avons projeté pour chaque paramètre textural les points sur les deux premiers axes de l'analyse en composante principale [76], [97]

Pour chacun des paramètres de texture, nous avons procédé à une classification ascendante hiérarchique munie de trois méthodes d'agrégation différentes (Ward, Complete, Single). Pour les trois méthodes, il n'a pas été possible d'obtenir des clusters correspondant aux classes de la vérité de terrain, ce qui indique que la forme du nuage de point ne permet pas d'utiliser une méthode non supervisée (figure 132, figure 133, figure 134).

Nous pouvons également observer sur l'ACP des points obtenus avec les descripteurs de Zernike que la classe avec RNPs est linéairement séparable des deux autres (figure 134). Cela nous pousse vers l'emploi d'une méthode de classification supervisée.

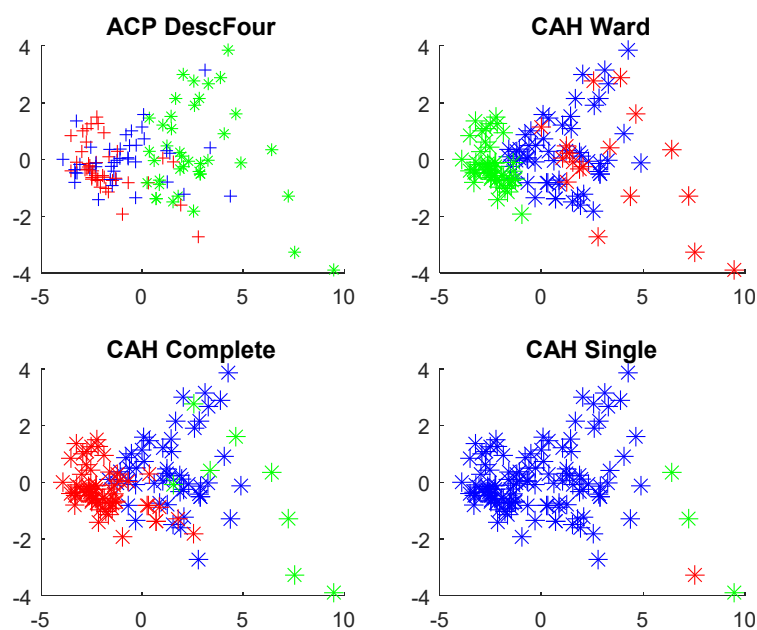


figure 132: Projection sur les 2 premiers axes de l'ACP des descripteurs de Fourier calculés pour les 120 cellules du set S2. En haut à gauche, la vérité de terrain, en vert, les cellules avec RNPs, en rouge, sans RNPs et en bleu, les cas difficilement décidables. Dans les trois autres projections, les couleurs des points sont décidées en utilisant une classification ascendante hiérarchique (non supervisée) et trois méthodes de regroupement de clusters (Ward, Complete et Single) pour séparer trois classes.

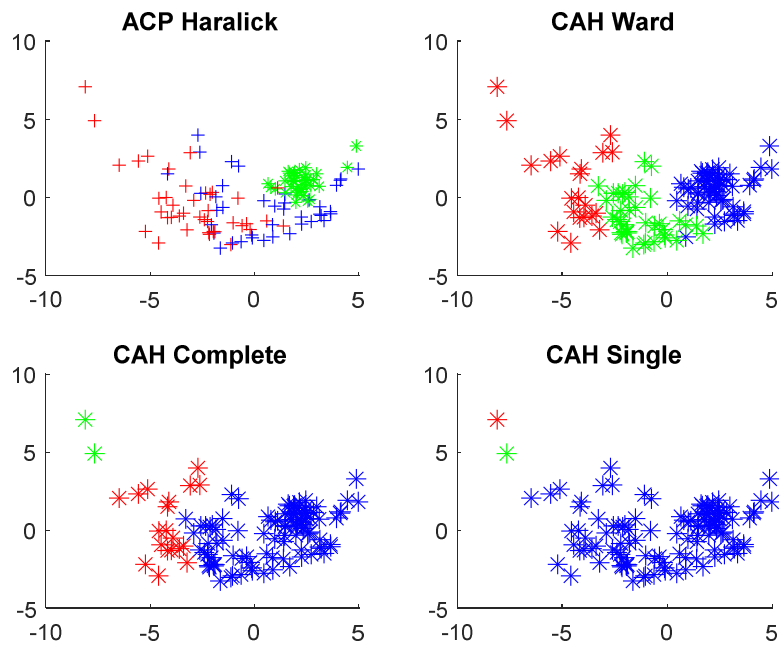


figure 133: Projection sur les 2 premiers axes de l'ACP des descripteurs de texture de Haralick calculés pour les 120 cellules du set S2. En haut à gauche, la vérité de terrain, en vert, les cellules avec RNPs, en rouge, sans RNPs et en bleu, les cas difficilement décidables. Dans les trois autres projections, les couleurs des points sont décidées en utilisant une classification ascendante hiérarchique (non supervisée) et trois méthodes de regroupement de clusters (Ward, Complete et Single) pour séparer trois classes.

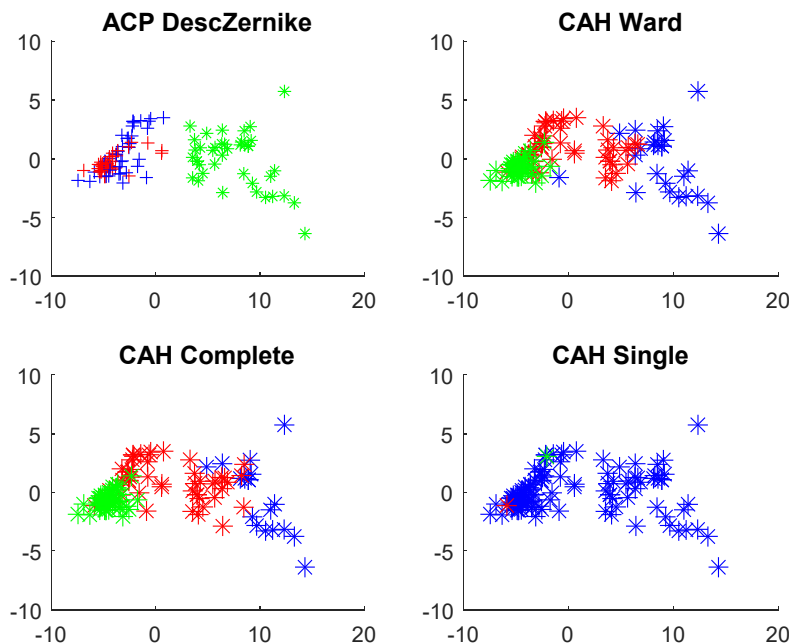


figure 134: Projection sur les 2 premiers axes de l'ACP des descripteurs de Zernike calculés pour les 120 cellules du set S2. En haut à gauche, la vérité de terrain, en vert, les cellules avec RNPs, en rouge, sans RNPs et en bleu, les cas difficilement décidables. Dans les trois autres projections, les couleurs des points sont décidées en utilisant une classification ascendante hiérarchique (non supervisée) et trois méthodes de regroupement de clusters (Ward, Complete et Single) pour séparer trois classes.

Nous avons testé vingt-deux méthodes de classification supervisée et résumé leur performances dans le tableau 9. Ce tableau montre que les performances des méthodes sont globalement très proches. Ces dernières sont essentiellement impactées par le choix du jeu de paramètres texturaux utilisés. Notre but étant d'étudier la pertinence de l'approche texturale pour l'estimation du nombre d'agrégats et non d'évaluer les performances des différentes méthodes de classification, nous faisons le choix d'utiliser l'analyse discriminante linéaire qui présente deux avantages :

- La simplicité de mise en œuvre, comparée à d'autres méthodes plus complexes et ne garantissant *a priori* qu'une faible amélioration des résultats avec notre jeu de données.
- L'analyse discriminante linéaire (LDA) est une méthode à la fois prédictive et descriptive. Cette nature descriptive est très intéressante pour la présentation et l'interprétation des résultats.

tableau 9: Aire sous la courbe ROC (AUC) obtenue pour chaque jeu de paramètres texturaux et pour les vingt-deux méthodes de classification supervisée disponible via l'application "classification learner" de Matlab®

Méthode	DGF	Haralick	Zernike	moyenne	ecart type
Bagged trees [110]	1	1	1	1	0
Boosted trees [111]	1	1	1	1	0
Complex tree [111]	0,98	0,99	1	0,99	0,01
KNN Coarse [112]	0,88	0,84	0,87	0,86	0,02
KNN Cosine [112]	0,95	0,99	1	0,98	0,03
KNN Cubic [112]	0,93	0,99	1	0,97	0,04
KNN Fine [112]	1	1	1	1	0
KNN Medium [112]	0,93	1	1	0,98	0,04
KNN Weighted [112]	1	1	1	1	0
Linear Discriminant [96]	0,97	0,97	1	0,98	0,02
Medium tree [111]	0,98	0,99	1	0,99	0,01
Quadratic Discriminant [98]	0,94	0,98	1	0,97	0,03
RUSBoosted trees [111]	0,99	1	1	1	0,01
Simple tree [111]	0,92	0,96	1	0,96	0,04
Subspace Discriminant [113]	0,97	0,98	1	0,98	0,02
Subspace KNN [112]	1	1	1	1	0
SVM Coarse Gaussian [114]	0,97	0,98	1	0,98	0,02
SVM Cubic [114]	1	0,99	1	1	0,01
SVM Fine Gaussian [114]	1	1	1	1	0
SVM linear [114]	0,97	0,98	1	0,98	0,02
SVM medium Gaussian [114]	0,99	1	1	1	0,01
SVM Quadratic [114]	1	0,99	1	1	0,01

L'étape suivante est de réaliser une LDA sur les jeux de paramètres texturaux extraits de l'ensemble S0. Cela nous permet d'évaluer le pouvoir discriminant de chaque jeu de paramètres texturaux pour les cellules avec et sans agrégats (figure 135, figure 136, figure 137). Ces trois projections montrent que les descripteurs de Zernike semblent être les mieux adaptés pour détecter la présence d'agrégat(s) dans les cellules. La frontière entre les points verts et les autres est très clairement définie. Le premier axe de la LDA discrimine clairement les cellules avec agrégat(s) des autres. Le second axe de la LDA sur les descripteurs de Zernike présente une bonne discrimination des cellules dont on est sûr qu'elles ne comportent pas d'agrégats (points rouges) des cellules pour lesquelles la présence ou l'absence n'est pas clairement établie. Les descripteurs de Fourier apparaissent beaucoup moins discriminants avec une frontière assez floue entre les points vert (avec RNPs) et les autres classes. Sur la projection des descripteurs de texture de Haralick, on peut observer que les points rouges, bleus et verts se répartissent en suivant un gradient (symbolisé par une flèche sur le graphique). Les descripteurs de texture de Haralick permettent donc une bonne discrimination des trois classes.

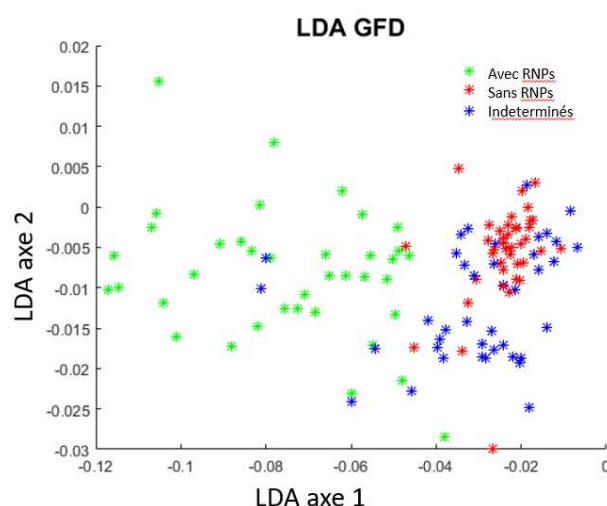


figure 135: projection sur les deux premiers axes de l'analyse en composantes principales des descripteurs de Fourier calculés sur l'ensemble S0

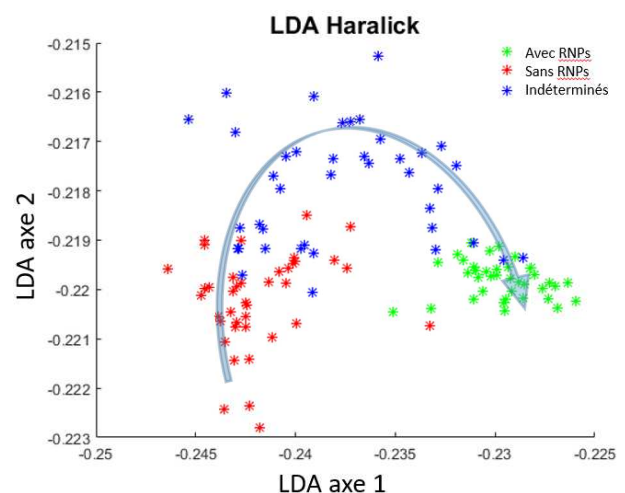


figure 136: projection sur les deux premiers axes de l'analyse en composantes principales des descripteurs de texture de Haralick calculés sur l'ensemble S0. La flèche indique le gradient selon lequel les points semblent s'organiser

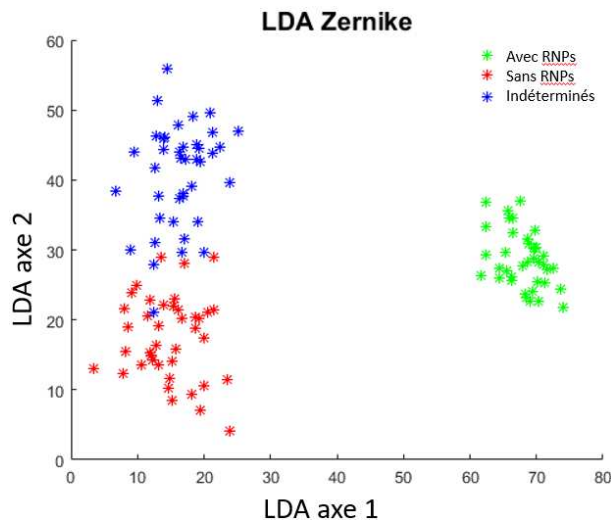


figure 137: projection sur les deux premiers axes de l'analyse en composantes principales des descripteurs de Zernike calculés sur l'ensemble S0

Ces projections montrent clairement que les paramètres texturaux permettent de détecter la présence d'agrégat(s) dans les cellules.

La répartition des points selon un gradient dans la projection des paramètres de texture de Haralick (figure 136) et la discrimination des classes rouges et bleues sur le deuxième axe avec les descripteurs de Zernike (figure 137) nous permettent de penser que les paramètres texturaux présentent un potentiel intéressant pour une étude plus fine des cellules et l'estimation du nombre d'agrégats.

v. Discrimination par le nombre d'agrégats pour un ensemble de cellules synthétiques

Nous avons vu précédemment (page 159) que l'obtention d'une vérité de terrain est impossible. Pour analyser la discrimination des cellules en fonction du nombre d'agrégats présents, nous avons alors construit un jeu de cellules synthétiques en simulant le nombre d'agrégats. Ce jeu de cellules nous permet donc de disposer d'une vérité de terrain.

Chaque cellule synthétique est constituée d'un disque gris dans lequel ont été insérés aléatoirement un nombre compris entre zéro et sept disque(s) blancs représentant les agrégats. Nous avons ensuite ajouté un faible bruit blancs gaussien (écart type de 10) afin d'éviter d'avoir des imageries uniformes, voire strictement identiques en absence d'agrégat.

La figure 138 montre la projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Fourier calculés sur l'ensembles des cellules synthétiques. Les points de la

classes 1 (sans agrégat) se séparent clairement mais les points des autres classes, bien qu'ils semblent s'organiser selon un gradient (nombre d'agrégats) symbolisé par la flèche, ne se séparent pas.

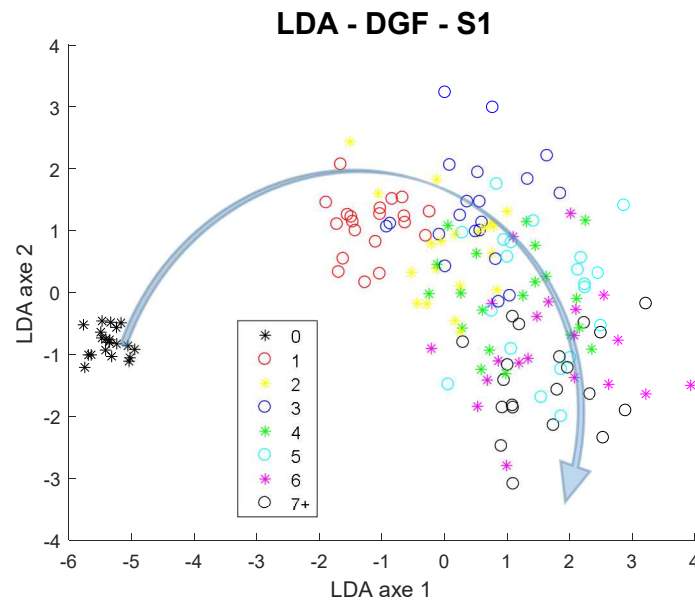


figure 138: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Fourier calculés sur les 160 cellules de l'ensemble S1 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7 agrégats. La flèche montre le gradient selon lequel les points s'organisent

La figure 139 montre la projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de texture de Haralick calculés sur l'ensemble S1. Comme avec les DGF, la classe 1, représentant les cellules sans agrégats, se distingue des autres.

Les sept autres classes se répartissent quasiment sur une droite en suivant un gradient en fonction du nombre d'agrégats présents. Les classes comportant le moins d'agrégats sont celles qui se séparent le mieux. Lorsque le nombre d'agrégats augmente, les points se confondent et il est moins évident de discriminer les cellules selon le nombre d'agrégats présents.

La figure 140 montre la projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Zernike calculés sur l'ensemble S1. En utilisant les descripteurs de Zernike, toutes les classes sont très clairement séparées. Ces résultats montrent que dans le cas idéal, les descripteurs de Zernike semblent très aptes à discriminer le nombre d'agrégats dans les cellules.

L'utilisation de l'ensemble de cellules synthétiques S1 nous permet d'illustrer le potentiel des paramètres texturaux pour l'estimation du nombre d'agrégats dans les cellules. Particulièrement, il est certainement possible d'évaluer le nombre d'agrégats présent dans les

cellules réelles en utilisant des paramètres texturaux. Les résultats obtenus avec les descripteurs de Zernike sont particulièrement encourageants puisque les huit classes de cellules synthétiques sont très clairement séparées.

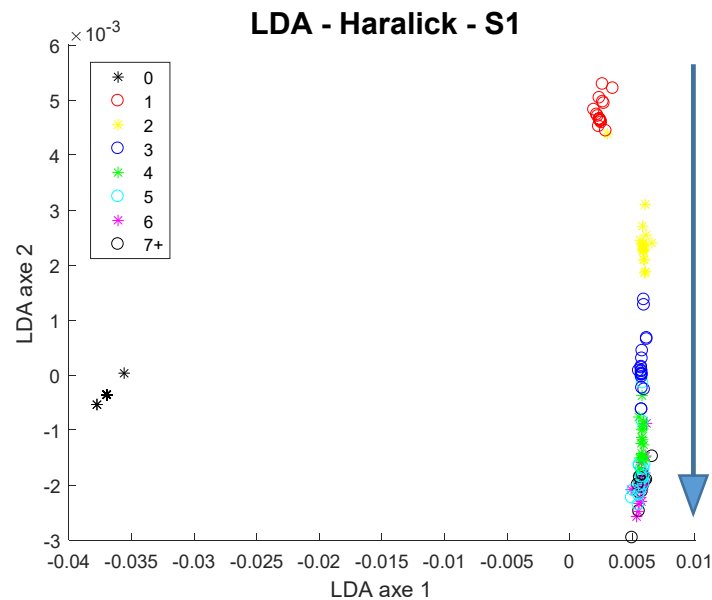


figure 139: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Haralick calculés sur les 160 cellules de l'ensemble S1 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7 agrégats. La flèche montre le gradient selon lequel les points s'organisent.

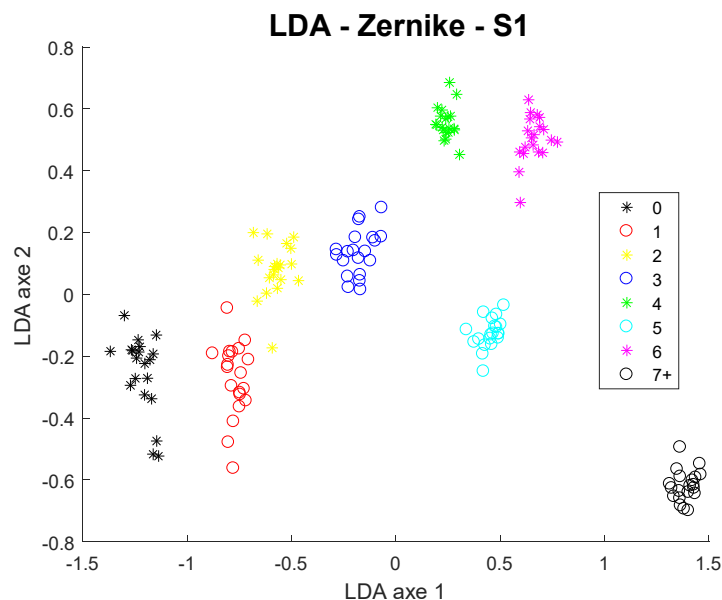


figure 140: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Zernike calculés sur les 160 cellules de l'ensemble S1 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7 agrégats

vi. Application au cas réel

Les résultats issus des jeux de paramètres texturaux, en particulier les descripteurs de Zernike, permettent de discriminer les cellules synthétiques en fonction du nombre d'agrégats présents. Nous allons maintenant généraliser cette approche au cas réel en utilisant deux ensembles de cellules, S2 et S3.

L'ensemble S2 (voir page 167) est composé de 181 cellules réparties dans huit classes allant de zéro à six agrégats présents et une classe comportant sept et plus agrégats. Ces cellules ont été sélectionnées parmi les 5000 cellules extraites des images originales. Cet ensemble représente *a priori* avec lequel les cellules seront classées.

L'ensemble S3 (voir page 167) est composé de 240 cellules qui ont été soumises à treize de nos collaborateurs. Les moyennes des comptages effectués seront notre référence pour évaluer les résultats obtenus.

Nous avons calculé les trois jeux de paramètres texturaux pour l'ensemble S2 et pour chacun, nous avons projeté les résultats sur les axes de l'analyse discriminante (figure 141, figure 142, figure 143).

Comme avec l'ensemble S1 de cellule synthétiques, la projection des descripteurs de Fourier calculés sur l'ensemble S2 de cellules réelles (figure 141) semble présenter un gradient de distribution selon le nombre d'agrégats présents. Cependant, contrairement à ce qui peut être observé via le cas synthétiques, les cellules réelles ne comportant pas d'agrégat ne forment pas de cluster indépendant et sont même confondues parmi les cellules comportant un unique agrégat.

La projection des paramètres texturaux de Haralick (figure 142) montre une meilleure séparabilité des classes. Bien que la topologie des points projetés soit très différente avec les cellules réelles, le résultat reste similaire à celui obtenu avec les cellules synthétiques. En effet, on observe un gradient de distribution. Comme avec les cellules synthétiques, la séparabilité est très bonne pour les classes comportant peu d'agrégats. Les classes comportant plus d'agrégats se confondent et sont difficilement discernables.

La projection des descripteurs de Zernike (figure 143) montre que les clusters de classes se chevauchent. Ils occupent néanmoins chacun une zone bien définie, ce qui n'est pas le cas avec les descripteurs de Haralick ou de Fourier. En particulier, les cellules présentant sept ou plus

agrégats se séparent nettement. Par ailleurs, un problème majeur apparaît avec les cellules sans agrégats dont les projections s'étalent sur celles des autres classes. En faisant abstraction de celles-ci, la séparabilité des autres classes reste significative.

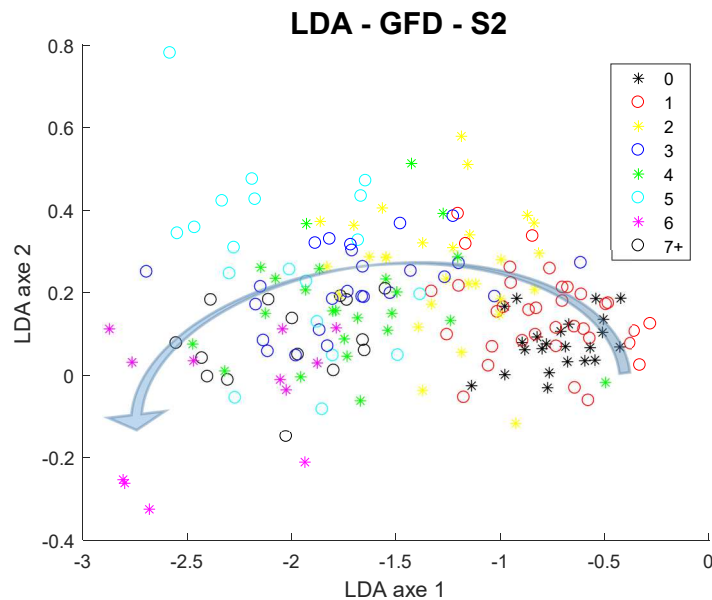


figure 141: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Fourier calculés sur les 181 cellules de l'ensemble S2 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7+ agrégats. La flèche montre le gradient de distribution observé

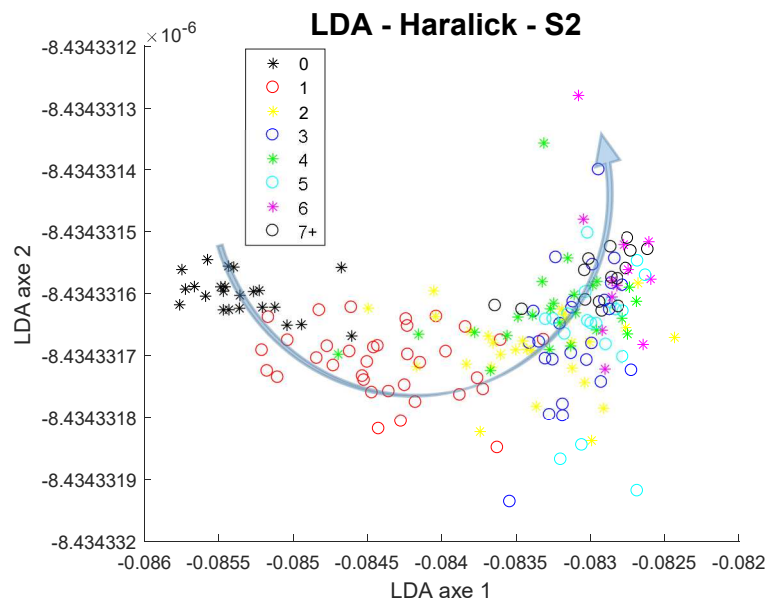


figure 142: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Haralick calculés sur les 181 cellules de l'ensemble S2 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7+ agrégats. La flèche montre le gradient de distribution observé

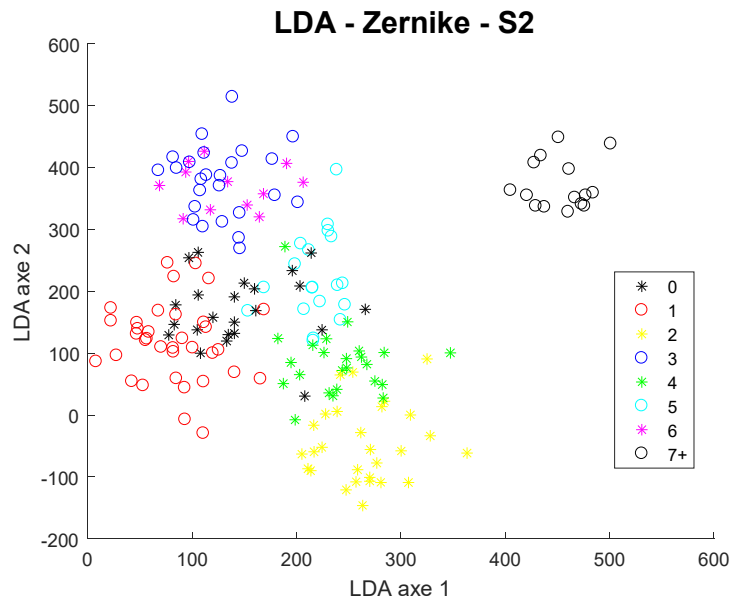


figure 143: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs de Zernike calculés sur les 181 cellules de l'ensemble S2 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7+ agrégats

Ces premiers résultats montrent que dans le cas réel, la discrimination des classes avec un seul jeu de paramètres texturaux n'est manifestement pas suffisante.

Nous proposons alors de fusionner les jeux de paramètres. En nous basant sur le fait que les descripteurs de texture de Haralick séparent correctement les classes avec peu ou pas d'agrégats tandis que les descripteurs de Zernike présentent le cas inverse, nous proposons de fusionner ces deux jeux de paramètres en un seul que nous appellerons ZH. Le résultat attendu est d'obtenir un jeu de paramètres profitant des avantages des deux approches à même de discriminer l'ensemble des classes.

La figure 144 montre la projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante du jeu de paramètres fusionnés ZH calculé sur l'ensemble S2. On observe une très nette amélioration de la discrimination des huit classes. Nous pouvons quand même constater un léger chevauchement des classes 3 et 5 représentant les cellules avec deux et quatre agrégats, ainsi qu'un chevauchement des classes 6 et 7, représentant les cellules avec cinq et six agrégats.

Néanmoins, compte tenu de la séparation des clusters sur cette projection, nous pouvons envisager une estimation relativement fiable du nombre d'agrégats en réalisant un apprentissage basé sur le jeu de paramètres fusionnés ZH. Nous évaluerons donc la performance de ce modèle en lui soumettant les 240 images de l'ensemble S3.

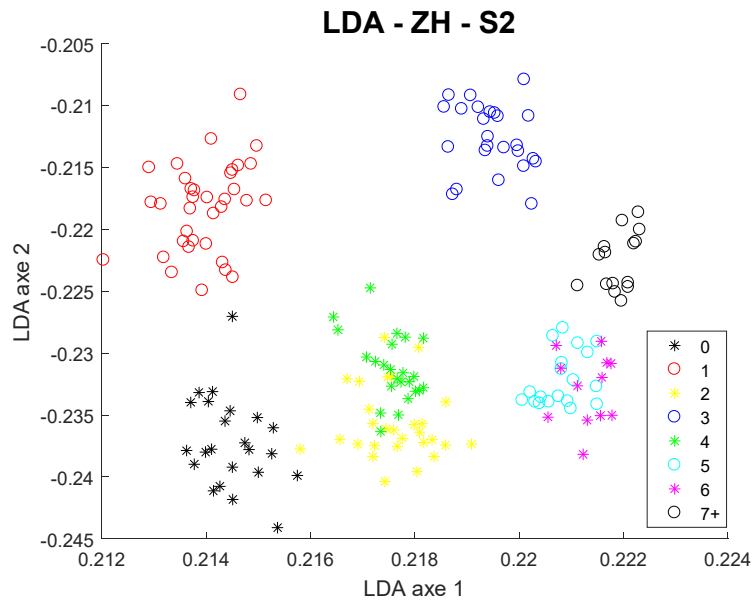


figure 144: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs fusionnés ZH calculés sur les 181 cellules de l'ensemble S2 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7+ agrégats

La projection des descripteurs de Fourier (figure 141), bien que les huit classes se confondent, semble présenter un gradient de répartition qui montre qu'ils contiennent une part d'informations pertinentes. Nous avons donc construit un nouveau jeu de paramètres, en fusionnant les descripteurs de Fourier avec les descripteurs ZH, que nous appelons ZHF.

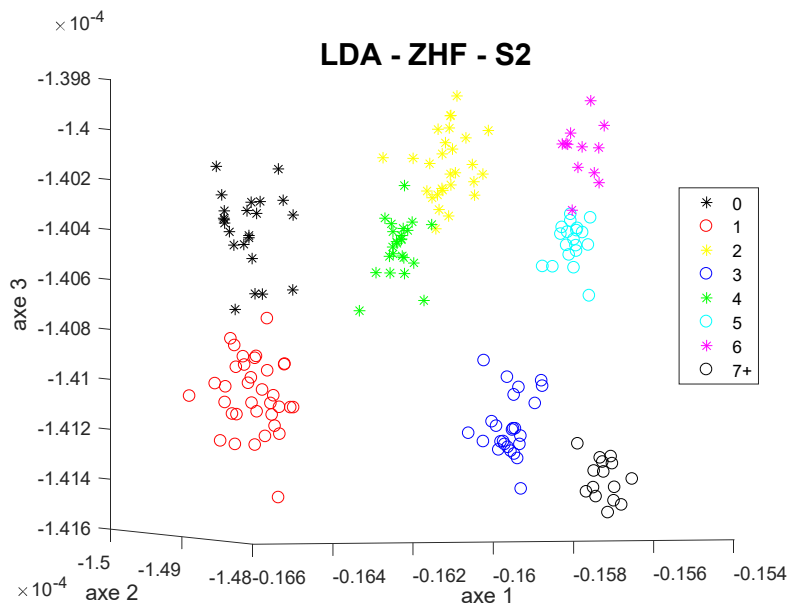


figure 145: Projection sur les trois premiers axes de l'analyse discriminante des descripteurs fusionnés ZHF calculés sur les 181 cellules de l'ensemble S2 réparties dans 8 classes pour les cellules comportant de 0 à 7+ agrégats

La figure 145 montre les projections des cellules de S2 obtenues avec le jeu de paramètres fusionnés ZHF sur les trois premiers axes de la LDA. Dans le cas des cellules réelles, le jeu de paramètres fusionnés ZHF permet une discrimination complète des huit classes.

vii. Comparaison comptages humain vs automatique

Nous avons vu que les descripteurs texturaux permettent de définir un modèle de séparabilité des classes satisfaisant. Nous avons soumis l'ensemble des imagerie de l'ensemble S3 à 13 experts (voir annexe 3). La moyenne des comptages manuels nous sert de référence. Nous avons alors évalué le nombre de RNPs pour chaque cellule de S3 en utilisant les modèles de classification définis précédemment en utilisant l'ensemble S2.

La figure 146 montre les résultats obtenus pour l'ensemble des comptages manuels réalisés ainsi que les résultats des estimations obtenues en utilisant les modèles basés sur les descripteurs de Haralick (H), sur les descripteurs de Zernike (Z) et sur les descripteurs fusionnés ZH et ZHF. Ces résultats sont projetés sur les deux premiers axes factoriels d'une analyse en composantes principales. Le tableau 10 résume les erreurs et biais obtenus avec les quatre modèles.

Pour l'erreur de classification, nous avons considéré, dans le cas de S2 (première ligne), que tout classement différent de la classe définie à priori est une erreur. Dans le cas de S3, notre référence étant la moyenne des comptages manuels. Nous avons considéré que toute estimation située en dehors de l'intervalle de confiance autour de la moyenne des comptages manuels est une erreur.

Le biais est défini par la distance euclidienne de la projection au centre de l'analyse en composante principale (ACP).

Pour ces quatre descripteurs, les estimations sont incluses dans l'ellipse de confiance. Les descripteurs de Haralick et de Zernike s'opposent sur le premier axe de l'ACP. Cet axe peut être interprété comme « l'optimisme » de l'estimation : globalement, les descripteurs de Haralick ont tendance à fournir une estimation haute du nombre d'agrégats (« optimiste ») alors que les descripteurs de Zernike donnent une estimation située dans la fourchette basse. Les descripteurs fusionnés ZH et ZHF semblent se rapprocher d'un consensus en se situant au plus proche du centre de l'ACP. Les descripteur ZH donnent un biais légèrement inférieur aux descripteurs ZHF, en revanche, les descripteurs ZHF permettent une réduction de 3% du nombre d'erreur de classification.

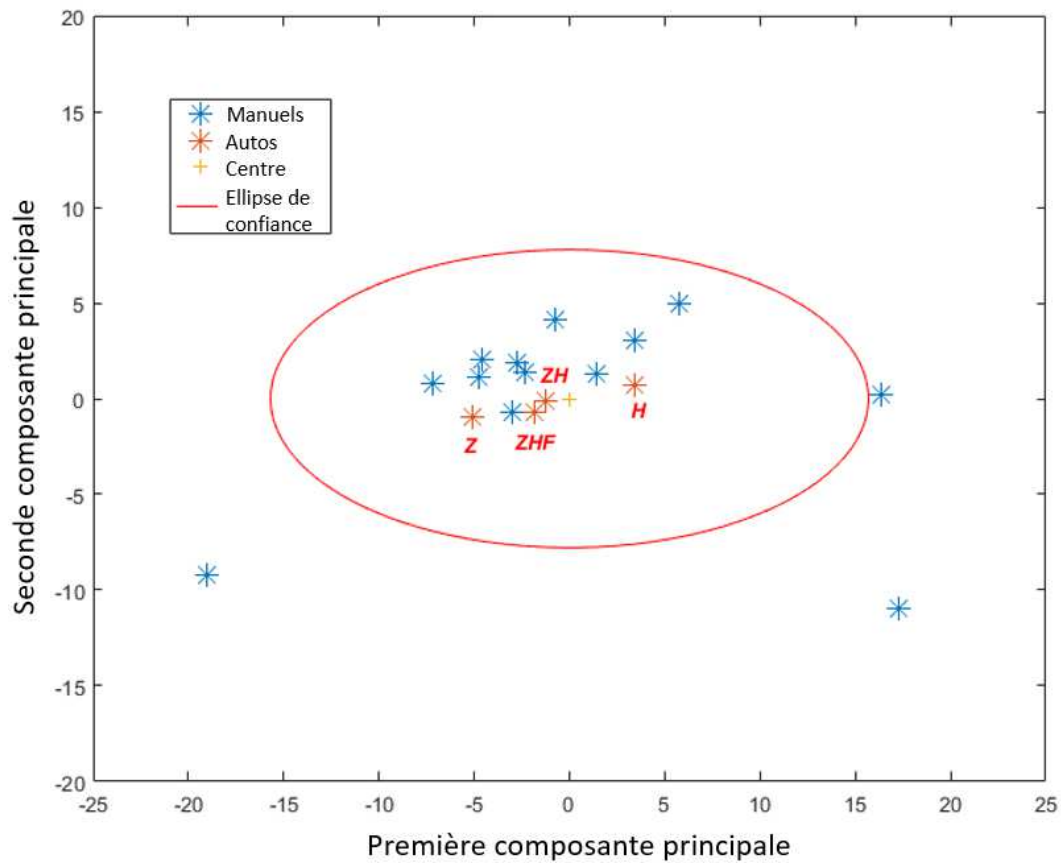


figure 146: Projection sur les deux premiers axes de l'analyse en composante principale des comptages humains (bleu) et des estimations faites par les modèles de classification basé sur les descripteurs de Zernike seuls (Z), les descripteurs de Haralick seuls (H) et sur les descripteurs fusionnés ZH et ZHF

tableau 10: erreurs de classification pour les ensembles S2 et S3. Biais d'estimation pour S3 obtenus avec les 4 descripteurs utilisés (%).

	Zernike	Haralick	ZH	ZHF
erreur S2 vs S2	2	30,5	0,5	0
erreur S3 vs $\overline{S3}$	23	33,75	18,3	15,4
biais	5,3	3,5	1,4	2,1

viii. Robustesse des modèles fusionnés ZH et ZHF

Pour tester la robustesse des modèles, nous avons repris l'ensemble S3 de 240 cellules pour lui ajouter des perturbations : bruit, luminosité, rotation, flou. Comme nous redimensionnons déjà

les cellules lors de l'extraction des paramètres, nous n'avons pas testé les changements d'échelle qui semblent, de fait, peut pertinents. Les modèles ZH et ZHF présentant les meilleures performances et celles-ci étant comparables, la robustesse a été testée sur ces deux modèles.

La robustesse au bruit est testée sur la base d'un bruit blanc gaussien additif dont nous avons fait varier l'écart type sur sept valeurs entre 1 et 40 (1, 3, 5, 10, 20, 30, 40). Le bruit a été ajouté à chaque image individuelle de cellule de l'ensemble S3, puis les cellules bruitées ont été soumises aux modèles de classification entraînés avec l'ensemble S2. Le tableau 11 résume les résultats obtenus. On peut observer que les performances des deux modèles chutent dès l'ajout d'un bruit relativement faible et que les performances du modèle ZHF se maintiennent mieux lorsque le bruit ajouté augmente. Avec les plus hauts niveaux de bruit utilisés, visuellement, les images de cellules restent reconnaissables mais présentent un aspect très rugueux lié au bruit. Autrement dit, le bruit induit une nouvelle texture dans les image de cellules. De fait, il semble logique qu'un modèle basé sur des jeux de paramètres texturaux résiste mal. Le modèle ZHF résiste mieux grâce à l'ajout des informations du descripteur de Fourier. Le bruit, par construction est un élément « haute fréquence » de l'image, on peut tirer de cette observation que l'information pertinente portée par les descripteurs de Fourier se situe plutôt dans les basses fréquences.

tableau 11: taux de bonne classification pour ZH et ZHF en fonction du bruit (%)

Bruit (σ)	0	1	3	5	10	20	30	40
ZH	82	69	68	70	55	66	63	54
ZHF	85	72	70	72	70	71	69	64

Cette résistance faible au bruit du modèle n'est pas un problème important dans la mesure où les images sont filtrées par la méthode de Kovesi lors de la segmentation. Le bruit « haute fréquence » résiduel sera donc très faible dans les images de cellule soumises aux modèles.

Nous avons évalué la robustesse vis-à-vis des changement d'intensité lumineuse en utilisant un facteur multiplicatif appliqué à chaque image individuelle de cellule. Nous avons utilisé six facteurs d'intensité (coefficients multiplicatifs), 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 et 1.6. Le tableau 12 résume les résultats obtenus. On observe que le modèle ZHF résiste bien mieux que le modèle

ZH. Le modèle ZHF donne encore des résultats acceptables lorsque le facteur de luminosité utilisé est de 1.6, alors que les images de cellules sont alors très saturées, en particulier au niveau des agrégats qui sont par nature plus clairs.

tableau 12: taux de bonne classification pour ZH et ZHF en fonction de l'illumination (%)

Facteur d'intensité	1	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6
ZH	82	79	75	75	73	66	63
ZHF	85	84	80	78	77	75	73

Nous avons évalué l'impact des changements d'orientations des cellules sur la robustesse du modèle en appliquant des rotations aux cellules selon cinq angles : 1, 5, 10, 20 et 45 degrés. La méthode de rotation de l'image que nous avons utilisé repose sur une interpolation bi cubique [115]. Le tableau 13 résume les résultats obtenus. Lors de la rotation des cellules, on observe une baisse d'environ 12% des performances des deux modèles dès le plus petit angle de rotation appliqué. Lorsque l'on augmente l'angle de rotation, il semble que les performances de chaque modèle finissent par stagner, avec une meilleure résistance du modèle ZHF. Les descripteurs de Zernike et les descripteurs de Fourier sont, par construction, invariant par rotation. Avec ces deux descripteurs, une légère différence de performance peut s'expliquer par l'interpolation effectuée lors de la rotation de l'image. La baisse de performance des deux descripteurs s'explique par l'usage des descripteurs de Haralick qui sont basés sur une matrice de cooccurrences qui n'est, elle, pas invariante par rotation. L'information supplémentaire apportée par les descripteurs de Fourier est, dans ce cas, très intéressante car elle permet au modèle de moins reposer sur les descripteurs de Haralick et par conséquent, d'être moins sensible à la rotation de l'image d'origine.

tableau 13: taux de bonne classification pour ZH et ZHF en fonction de l'angle de rotation (%)

Angle (°)	0	1	5	10	20	45
ZH	82	70	70	63	59	59
ZHF	85	74	72	68	67	68

Pour faire varier la netteté des cellules, nous avons utilisé un filtre gaussien que nous avons paramétré avec quatre écarts type : 0.1, 0.5, 1 et 2. Le tableau 14 résume les résultats obtenus. Avec les deux niveaux de flou les plus bas, les images conservent visuellement leur texture et cela se retrouve dans les résultats des deux modèles qui sont peu impactés. Avec les deux niveaux de flou les plus important, les cellules sont visuellement beaucoup plus « lisses », comme lors de l’ajout de bruit, la modification de la netteté de l’image tend à en modifier la texture et cela explique la mauvaise performance des deux modèles lorsque les cellules deviennent trop floues. On observe que le modèle ZH semble mieux résister que le modèle ZHF : A l’inverse de ce qu’il se passe lorsque l’on ajoute du bruit à l’image (des hautes fréquences), la modification de netteté tend à la lisser, ce qui se traduit par la disparition des plus hautes fréquences. Dans ce contexte, l’ajout des descripteurs de Fourier au modèle ZH ne semble pas apporter de gain, au contraire.

tableau 14: taux de bonne classification pour ZH et ZHF en fonction de la netteté (%)

Flou (σ)	0	0.1	0.5	1	2
ZH	82	82	78	65	44
ZHF	85	85	81	56	41

ix. Conclusion (fluorescence diffuse)

En présence de fluorescence diffuse, la problématique était d’évaluer le nombre de RNPs dans chaque cellule. Nous avons validé la possibilité d’estimer ce nombre à l’aide de jeux de paramètres texturaux fusionnés et d’une méthode de classification supervisée. Nous arrivons à un taux de bonne classification de 85% en fusionnant les trois jeux de paramètres, avec un biais de 2.1, inférieur au biais minimum constaté pour un comptage manuel.

Nous disposons donc d’une approche permettant de réaliser une estimation fiable et reproductible du nombre d’agrégats présents. Cette méthode est également automatisée, ce qui permet de traiter un très grand nombre de cellules et de fournir des résultats statistiques sur le développement des agrégats dans des conditions de stress spécifiques.

Les méthodes de classification basées sur les jeux de paramètres texturaux ne sont cependant pas applicables dans le cas d’absence de fluorescence diffuse car nous ne disposons alors pas de contours clairement définis pour chaque cellule. Avec du matériel permettant de disposer

des images en transmission, pour utiliser ces méthodes, il serait nécessaire de fusionner les images en transmission avec les images en fluorescence.

b. Cas n°2 : absence de fluorescence diffuse

i. Introduction

Dans le cas d'absence de fluorescence diffuse, l'image ne représente que les zones où la fluorescence se concentre, c'est-à-dire, uniquement les zones correspondant aux agrégats ribonucléoprotéiques. La segmentation de ces zones, basée sur un seuillage [116], ne pose pas de problème. La problématique, en l'absence de fluorescence diffuse, se scinde alors en deux problèmes distincts :

- Les zones d'agrégats sont faciles à segmenter du fait de la fluorescence, néanmoins, lorsque les agrégats sont nombreux et/ou rapprochés, il arrive fréquemment qu'une unique zone corresponde à plusieurs agrégats. L'objectif est alors de segmenter chaque agrégat.
- Une fois les agrégats identifiés individuellement, le second objectif est de fournir un résultat statistique sur le nombre d'agrégats par cellule. Le problème va donc être de regrouper ces agrégats en retrouvant les contours les plus probables des cellules, ceux-ci ne nous étant pas accessible directement du fait de l'absence des images en transmission.

ii. Segmentation des zones d'agrégation

La figure 147 montre une image dans laquelle la fluorescence diffuse est insuffisante pour parvenir à segmenter les cellules individuellement. Elle montre également une zone d'agrégation en particulier. Cette zone d'agrégation est représentative de la problématique d'identification des agrégats car elle comporte, sans aucun doute possible, plusieurs agrégats distincts. Le détail de la zone d'agrégation permet également de voir une légère fluorescence diffuse, insuffisante pour permettre de segmenter la cellule et donc assimilable à du bruit pour la segmentation des agrégats. La figure 148 (B) montre le résultat de la segmentation, celle-ci est faite par l'application d'un seuillage [116] sur l'image d'origine ré-échantillonnée pour passer d'une résolution de 1024x1024 à 341x341. Ce nouvel échantillonnage induit un lissage de l'image et permet dans le même temps de traiter le bruit et de définir des zones d'agrégation plus régulières

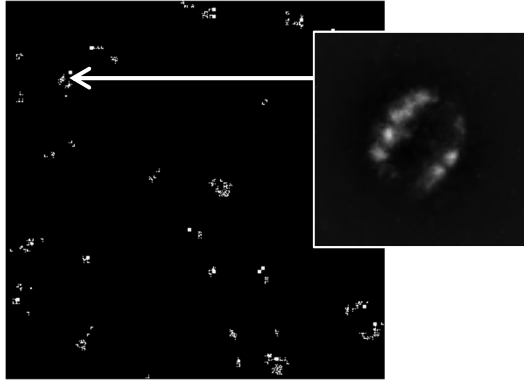


figure 147: zoom sur une zone d'agrégation

A partir de l'image seuillée, il s'agit maintenant de séparer les agrégats. Pour cette segmentation, nous utilisons la méthode de ligne de partage des eaux (LPE) [117]. La méthode de ligne de partage des eaux nécessite un gradient pour pouvoir fonctionner, or, il n'existe pas de gradient dans les zones d'agrégats (image binaire). Dans l'implémentation de base proposée par Matlab®, ce gradient est construit en considérant la distance d'un point au bord du cluster de pixel considéré. Autrement dit, le gradient est construit en fonction de la forme du cluster de pixel. Pour une application plus pertinente de la méthode de la LPE, nous avons utilisé l'image d'origine, légèrement floutée (convolution avec masque moyenneur circulaire de rayon 3 pixels), pour construire un gradient à l'intérieur des clusters. Les figure 148 C et D montre la différence de segmentation entre la méthode de base et la méthode basée sur l'image d'origine. Pour ce cas particulier, nous arrivons à une segmentation donnant six agrégats distincts tandis que l'implémentation classique³⁰ donne sept agrégats. Nous pouvons remarquer que sur cet exemple en particulier, un résultat de cinq à huit agrégats peut être considéré comme bon. Le résultat donné par chacune des deux méthodes peut donc être considéré comme correct. Cette remarque souligne la difficulté d'établir une vérité de terrain claire. Avec la méthode basée sur les gradients de l'image d'origine, les zones définies pour chaque agrégat semblent correspondre correctement aux agrégats réels alors que la méthode LPE classique donne des zones qui ne correspondent à aucune réalité. Nous utiliserons donc la méthode basée sur les gradients de l'image pour séparer les agrégats individuellement.

³⁰ <https://fr.mathworks.com/help/images/ref/watershed.html>

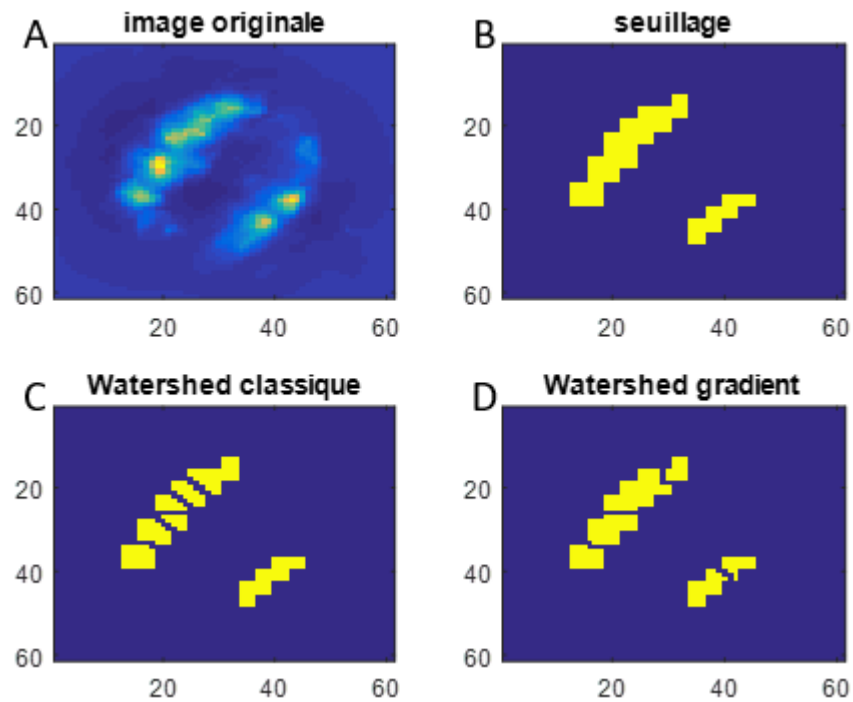


figure 148: segmentation des agrégats. A) image originale. B) image seuillée. C) application du watershed avec la méthode classique basée sur la forme des clusters. D) application du watershed avec la méthode basée sur les gradients

iii. Regroupement des agrégats

Les agrégats étant correctement segmentés, la seconde problématique est l'estimation du nombre d'agrégats par cellule. Autrement dit, le regroupement des agrégats dans leurs cellules supposées. Pour ce regroupement, nous proposons une approche basée sur la classification ascendante hiérarchique. La métrique utilisée correspond à la distance Euclidienne entre les éléments ainsi que la méthode de Ward pour le regroupement des clusters. La figure 149 montre le dendrogramme et l'évolution de la distance d'agrégation des éléments. La question est alors de trouver la frontière de coupure dans le dendrogramme qui crée des clusters correspondant aux cellules supposées. Il nous faut donc trouver un critère pertinent pour définir cette frontière. Il n'est pas possible de détecter clairement une rupture de pente dans la distance d'agrégation des clusters et nous n'avons pas *a priori* sur le nombre de cellules présentes.

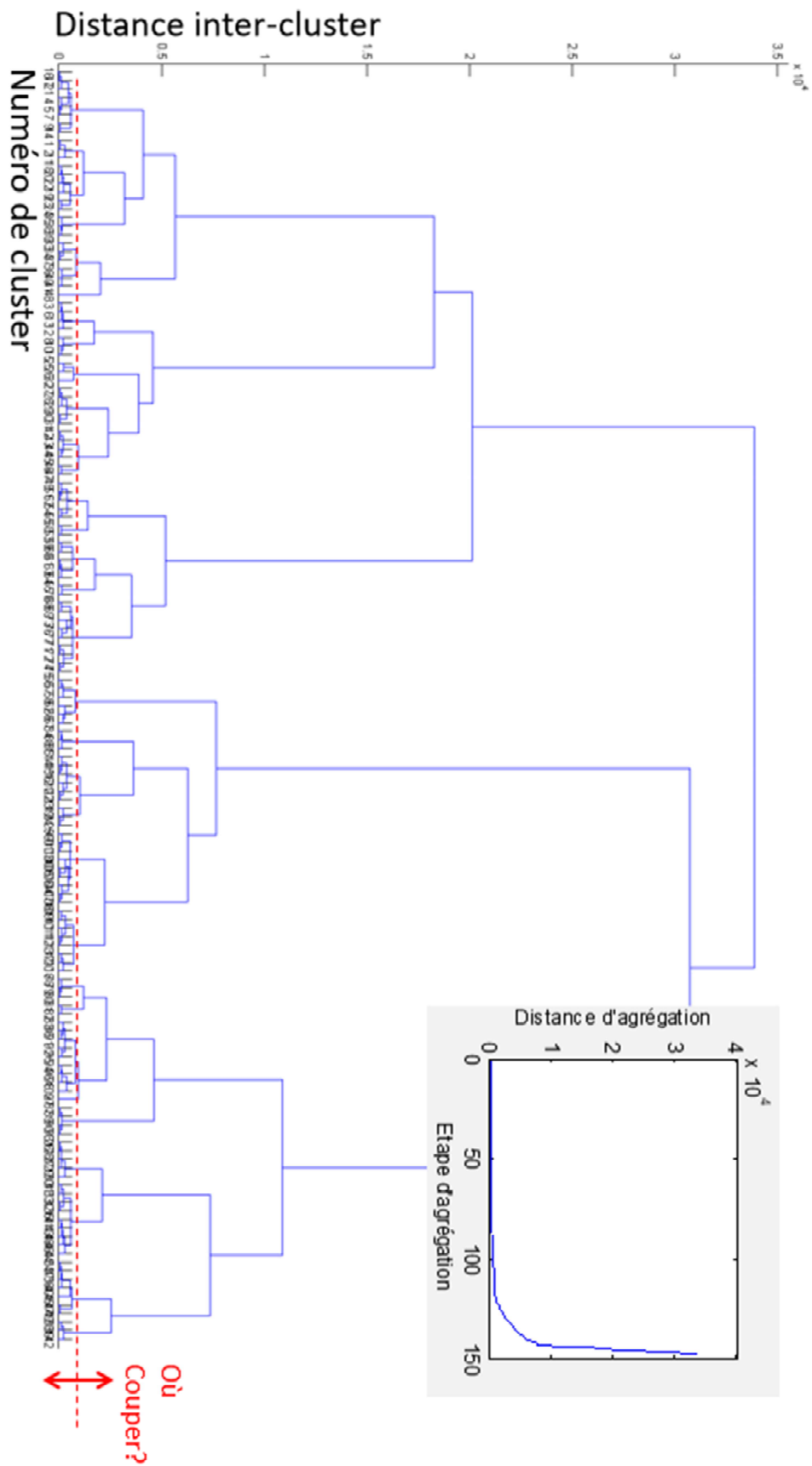


figure 149: dendrogramme du regroupement des agrégats (distance Euclidienne et méthode de Ward). Dans l'encart, la distance d'agrégation en fonction de l'étape d'agrégation

La seule connaissance *à priori* dont nous disposons est la taille moyenne des levures *saccharomyces cerevisiae* ($\sim 10\mu\text{m}$). La taille en pixels peut donc être déduite en considérant le grossissement du microscope utilisé, la résolution de l'image et la taille du capteur. Dans le cadre de cette expérience, nous avons estimé le diamètre des cellules à environ 50 pixels. A partir de ce diamètre et de l'observation que les agrégats sont le plus souvent positionnés sur la périphérie des cellules, nous avons calculé la distance moyenne entre deux agrégats (figure 150).

Le théorème de Pythagore nous donne :

$$d = D\sqrt{(1 + \cos 2\theta)^2 + \sin^2 2\theta} = D\sqrt{2 + 2\cos 2\theta}$$

La valeur moyenne de d , est donc :

$$\bar{d} = \frac{D}{2\pi} \int_0^\pi \sqrt{2 + 2\cos 2\theta} d\theta = \frac{2D}{\pi} \approx 0.64D$$

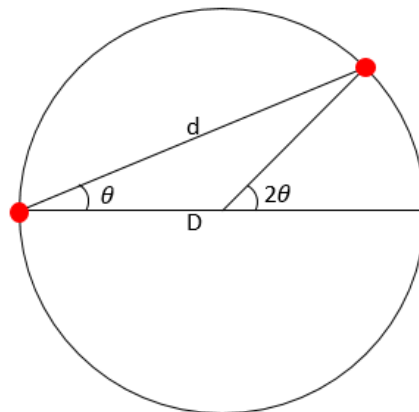


figure 150: schéma explicatif pour le calcul de la distance moyenne entre deux points du périmètre d'un cercle

A partir de ce calcul, nous avons modifié la distance euclidienne en considérant que deux agrégats plus éloignés que $0.64D$, soit 32 pixels, ne peuvent pas appartenir à la même cellule. Autrement dit, toute distance supérieure à 32 pixels a été substituée par une distance « infinie » (pour cette application, nous avons défini un « infini » égal à 1000, c'est-à-dire une distance hors des limites de l'image).

La figure 151 montre de manière visuelle les regroupements d'agrégats effectués. En l'absence de vérité de terrain composée des contours réels des cellules, il est impossible de quantifier

précisément le taux d'erreur de ces regroupements. Visuellement, bien qu'il y ait quelques regroupements discutables, ils sont en général manifestement pertinents dans la plupart des zones.

La figure 152 montre le dendrogramme obtenu avec la distance d'agrégation modifiée. La distance d'agrégation en fonction de l'étape de la classification est montrée dans l'encart de la figure. On constate une nette rupture de pente qui nous permet de définir précisément un seuil de coupure dans le dendrogramme.

Pour l'image donnée en exemple, chaque cellule contient en moyenne 2.4 agrégats, avec un écart type de 1.1.

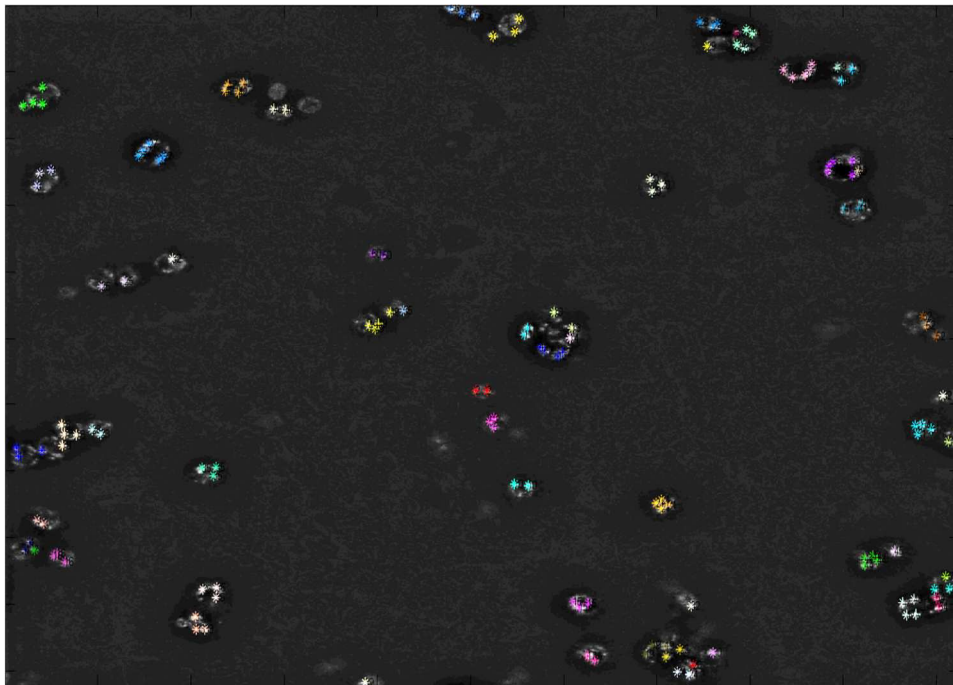


figure 151: regroupement d'agrégats dans des cellules déterminées par la CAH. Pour une question de visibilité, les couleurs de l'image segmentée ont été inversées (fond blanc et agrégats en noir). Chaque groupe de couleur définit une cellule de regroupement des agrégats

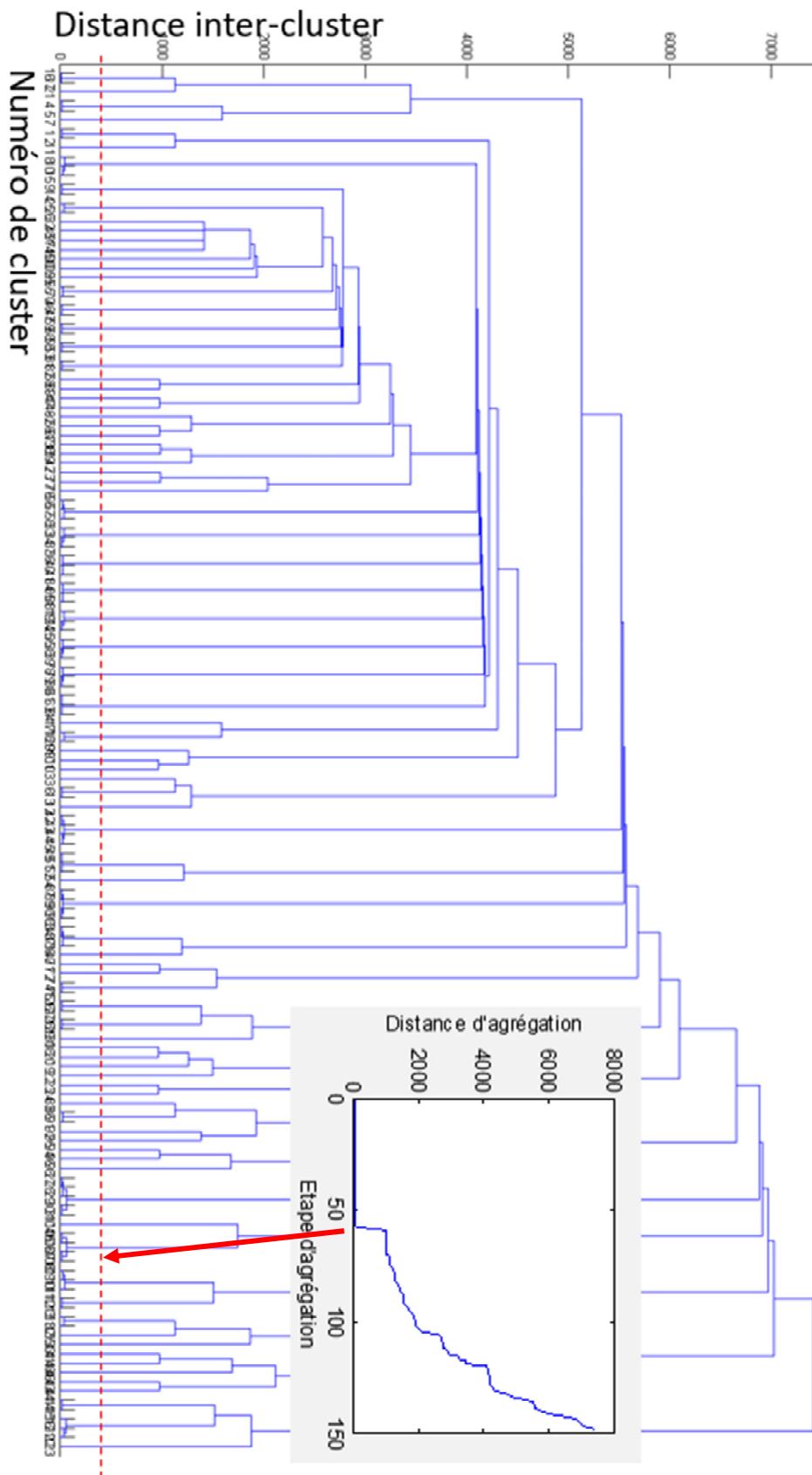


figure 152: dendrogramme obtenu avec la majoration des distances supérieures à 32 pixels. L'encart montre la distance d'agrégation en fonction de l'étape d'agrégation, la flèche montre le niveau de coupure obtenu

iv. Conclusion (Absence de fluorescence diffuse)

En absence de fluorescence diffuse et ne disposant pas d'images en transmission nous permettant d'identifier les cellules, la problématique était le regroupement pertinent des agrégats. A partir d'une segmentation individuelle des agrégats, nous avons proposé une méthode basée sur la CAH et une distance spécifique permettant de les regrouper dans des cellules logiques afin d'être en mesure de fournir une estimation statistique sur leur répartition dans les cellules présentes dans l'image. Ne disposant pas des contours des cellules, nous n'avons pas pu valider ce résultat. Cette validation serait possible en disposant des images en transmission. Cette estimation permettra au biologiste d'avoir un point de vue objectif sur le développement des agrégats dans les conditions spécifiques de leur expérience.

4. Conclusion

L'étude des agrégats ribonucléiques est un enjeu important de la microbiologie et notre objectif était de proposer des méthodes permettant de quantifier leur développement dans un grand nombre de cellules. Plus précisément, nos objectifs étaient l'automatisation, la répétabilité et la robustesse de la méthode proposée afin de fournir une vue statistique du développement des RNPs pour l'étude biologique.

En ce qui concerne notre objectif d'automatisation, dans le cas de la fluorescence diffuse, l'utilisation de méthodes de classification supervisées nous oblige à une étape manuelle de création d'un ensemble d'apprentissage. Cet ensemble étant défini, l'estimation du nombre d'agrégats par cellule est 100% automatisé. En absence de fluorescence diffuse, nous devons manuellement spécifier la taille moyenne d'une cellule (en pixels) mais une fois ce paramètre établi, la méthode est en mesure de traiter une large collection d'images. Nous sommes donc en mesure, via les deux approches proposées, d'automatiser au maximum le traitement des images microscopiques de cultures présentant des RNPs.

En ce qui concerne notre objectif de répétabilité, dans les deux cas, nous avons proposé des approches permettant d'avoir la certitude que les résultats seront identiques d'une itération de l'estimation à l'autre. Nous avons vu, lorsque nous avons demandé des comptage manuels qu'une telle stabilité est impossible humainement. Les approches proposées répondent donc à l'objectif de répétabilité.

La robustesse de l'approche texturale aux perturbations est acceptable en ce qui concerne le bruit et le changement d'intensité lumineuse. Avec des images floutées, les modifications de texture sont telles que les méthodes, basées sur des paramètres texturaux, échouent dès que le flou devient trop important. La modification des résultats obtenus en fonction de l'angle des imagerie de cellules est plus problématique et essentiellement due à l'utilisation des paramètres de Haralick qui ne sont pas invariants par rotation. L'utilisation d'autres paramètres texturaux pourraient permettre une nette amélioration de la résistance aux changements d'orientation de l'image.

Dans les deux cas, nous avons été en mesure de fournir des résultats sous forme statistique, en donnant, pour chaque image microscopique acquise, une estimation de la moyenne et l'écart type du nombre d'agrégats par cellule présente dans l'image. Cela fournit au biologiste une information synthétique sur le développement des agrégats dans le cadre de son expérience. La figure 153 montre un exemple d'histogramme de répartition des nombres de RNPs par cellule pour une de nos 210 images. Dans ce cas, les cellules ont développé une moyenne de 2,4 RNPs ($\sigma = 1.1$).

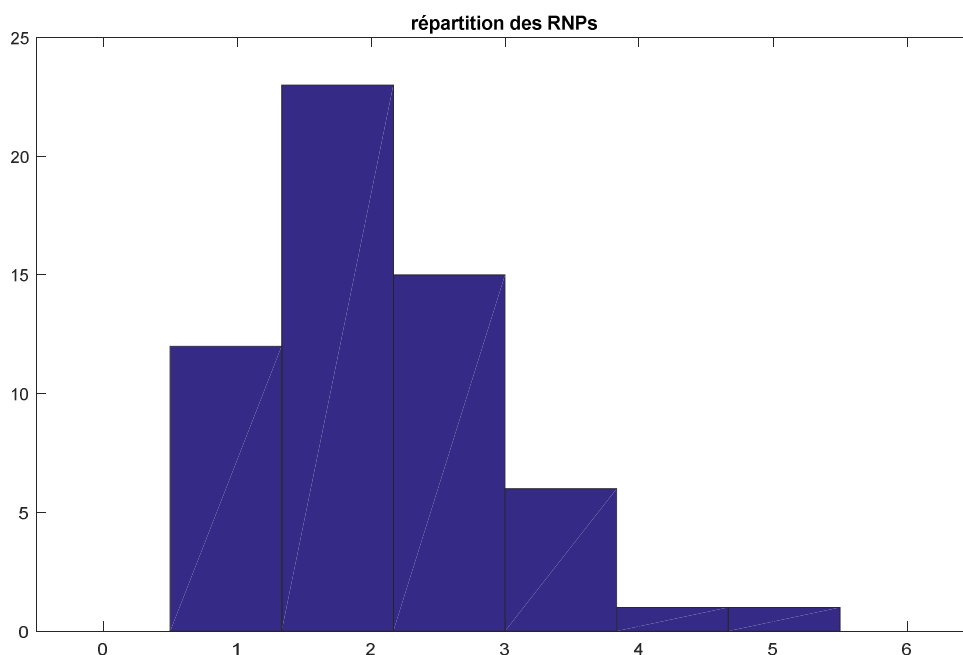


figure 153: exemple d'histogramme de répartition du nombre de RNPs par cellule pour une image

Un problème reste cependant à résoudre, il s'agit d'automatiser le choix de la méthode à utiliser en fonction de l'image, c'est à dire, évaluer automatiquement le niveau de fluorescence diffuse dans l'image afin de sélectionner la bonne approche.

Conclusion générale

Rappel :

Le travail de cette thèse s'est inscrit dans un projet au sein de l'équipe PMB de l'UMR PAM destiné à évaluer l'effet des stress osmotiques et thermiques sur des cellules vivantes modèles (*Saccharomyces cerevisiae*). Ces recherches nécessitent l'acquisition et l'analyse de nombreuses images microscopiques. L'extraction d'information de ces images représente un coût très important et dépasse parfois les compétences du biologiste. L'extraction manuelle de variables pertinentes pose de nombreuses difficultés dont les trois principales sont :

- **La subjectivité de l'expert**
- **La mauvaise reproductibilité du protocole d'extraction**
- **Le coût financier, temporel et humain**

Pour éviter ce travail manuel fastidieux et les problèmes qui en découlent, l'analyse d'images microscopiques a constitué un outil des plus intéressants.

Cette thèse apporte un ensemble d'outils opérationnels qui permet d'extraire de manière automatique et robuste les informations pertinentes pour l'exploitation de ces images par les experts biologistes.

Les deux objectifs principaux à atteindre étaient :

- Une **standardisation** de l'extraction des variables pertinentes
- Une **automatisation** maximale des traitements proposés

Thesaurus :

Nos travaux nous ont permis de nous positionner à l'interface de deux disciplines, la microbiologie et le traitement d'image. Des besoins des microbiologistes, nous avons mis en évidence de nombreuses problématiques liées au traitement d'image. Ces problématiques se situent à deux échelles d'analyse :

- A l'échelle de la lame d'observation :
 - Afin de répondre à une question sur le taux de survie des cellules en présence de stress osmotique, nous avons eu pour but de quantifier des levures

saccharomyces cerevisiae disposée sur une lame de comptage de Malassez. Ces travaux nous ont amenés à extraire les informations pertinentes liées à la lame de comptage. Nous avons alors proposé une approche de caractérisation de la grille basée sur l'**identification d'une signature dans l'espace de Fourier**.

Le résultat obtenu est une caractérisation automatique, précise et robuste de la grille, particulièrement adapté à la forte variabilité des images.

- Si la grille est essentielle pour obtenir un comptage exploitable (concentration cellulaire), elle représente un artefact gênant pour son automatisation. Nous avons alors proposé une méthode permettant de **d'effacer la grille en remplaçant sa signature par les valeurs iso-fréquentielles moyennes** dans l'espace de Fourier.

L'application de cette approche a permis d'obtenir une solution efficace pour effacer la grille tout en conservant l'intégrité des cellules dans l'image.

- Pour le comptage cellulaire, soit l'objectif final, nous proposons deux innovations aux méthodes de détection de cercle par transformées de Hough : les **listes locales des contributeurs** (LCL) et la **matrice d'usage des contributeurs** (UCM). Ces deux structures permettent d'optimiser la recherche itérative des maximums dans la matrice d'accumulation via la déconstruction intelligente de ces derniers. L'objectif principal de ces apports est alors de minimiser les erreurs telles que les faux positifs et les faux négatifs.

Les résultats obtenus montrent la pertinence de ces deux structures pour l'amélioration de la précision de la détection de structures pseudo-circulaires dans l'image comparé aux approches classiques.

- A l'échelle de la cellule : les microbiologues souhaitent explorer les effets de stress thermiques sur la survie cellulaire. Ces stress entraînent la formation d'agrégats ribo nucléoprotéiques (RNPs) dans les cellules. L'objectif est alors d'estimer précisément le nombre de ces RNPs pour chacune. Une expérience d'estimation manuelle du nombre de RNPs a été effectuée en se basant sur un échantillon de 240 cellules soumises à treize compteurs ; la grande variabilité des comptages obtenus a mis en évidence la difficulté de cette tâche. Afin d'obtenir une estimation robuste de ce nombre, nous avons proposé une **approche méthodologique basée sur l'analyse de texture et l'utilisation de méthodes de classification**.

Les résultats montrent que les modèles développés permettent d'obtenir une estimation fiable du nombre de RNPs pour un grand volume de cellules quel que soit le niveau de fluorescence de l'image.

Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude des objets microscopiques à une large échelle :

Perspectives

A travers le souhait des différents partenaires d'analyser les images microscopiques pour en extraire des informations pertinentes, nous avons développé des outils méthodologiques adaptés. Ces approches ouvrent par conséquent des perspectives intéressantes :

A la suite de l'étude sur la grille de comptage de Malassez et des résultats obtenus pour son effacement, un projet nous a été soumis par la Satt grand est. Il s'agit d'effacer un filtre dans une image acquise par leurs soins. Ce filtre représente un micro grillage très fin dans l'image et apporte une nouvelle problématique dans la mesure où contrairement à la grille de Malassez, il représente la partie principale de l'image. Ceci a pour effet d'inverser le rapport entre le signal informatif sous-jacent (celui que l'on cherche) et le signal de la grille. En conséquence, effacer le signal de cette grille dans l'espace de Fourier revient à détruire une grande partie du signal recherché et impose de trouver de nouvelles solutions.

Le travail effectué pour l'estimation du nombre d'agrégats dans les cellules nous a conduit à conclure que les méthodes de classification basées sur des paramètres texturaux permettent une estimation fiable et répétable du nombre d'agrégats. Dans cette thèse, nous avons exploré l'utilisation de méthodes de classification classiques et éprouvées et finalement opté pour une analyse discriminante linéaire afin de profiter de sa double nature, descriptive et prédictive. Dans le futur, en se basant sur l'évolution quantitative de la banque d'images disponibles, il sera intéressant d'explorer les méthodes basées sur l'apprentissage profond (deep learning). Une des principales limitations de l'apprentissage profond étant la taille de l'ensemble d'apprentissage nécessaire, nous explorerons donc ces méthodes dès que nous aurons obtenu un nombre suffisant d'images.

Nous avons séparé le travail sur l'estimation du nombre d'agrégats en deux parties, dans le cas de présence de fluorescence diffuse et dans le cas où celle-ci est absente. Le deuxième cas est

particulier dans le sens où il ne se présentera uniquement dans le cas où les images en transmission ne sont pas disponibles. Ce sera donc, dans la plupart des cas, un problème inexistant. Néanmoins, nous avons jugé utile de le résoudre car, bien qu'évitable en disposant du matériel adéquat, ce problème s'est tout de même posé pour nous. Cela soulève une question à laquelle nous n'avons pas encore répondu dans le cadre de l'automatisation complète du processus : comment, à partir d'une image, sélectionner automatiquement la bonne de ces deux méthodes ? Autrement dit, comment déterminer automatiquement la présence suffisante ou non de fluorescence diffuse ? Il serait envisageable de mettre en place une première estimation de la taille des clusters engendrés par le seuillage de base (donnant les cellules ou les agrégats seuls) pour tenter de trouver un critère permettant de choisir le bon paradigme.

Une des limitations de la méthode d'estimation du nombre d'agrégats par classification basée sur des méthodes texturales est qu'il n'est pas possible d'accéder à une statistique sur leur taille moyenne. Cette information sera intéressante dans le cadre de nouvelles études et il sera intéressant de se pencher sur une extension de cette méthode pouvant permettre l'estimation de la taille des agrégats en plus de leur nombre, ainsi que d'autres paramètres intrinsèques aux agrégats et pouvant se révéler pertinents pour les microbiologistes.

Le travail sur les agrégats a été mené sur des images représentant un plan focal précis. Bien entendu, les cellules sont tridimensionnelles et dans l'avenir, pour une estimation plus juste du nombre d'agrégats, il sera intéressant d'acquérir des piles d'images afin de reconstruire un modèle 3D de chaque cellule dans le but d'estimer plus justement le nombre d'agrégats présents dans l'ensemble du cytoplasme.

Toutes ces voies méritent le plus grand développement. L'intérêt de faire évoluer ces techniques et de permettre leur application sur de tels sujets s'inscrit directement dans l'esprit des recherches de l'équipe PMB au sein de l'UMR PAM.

Durant ces années de thèse, nous avons abordé plusieurs grands thèmes situés entre le traitement des images et la microbiologie. Ces grands thèmes sont : le traitement et l'analyse d'images microscopiques et l'extraction d'informations pour la microbiologie.

Notre contribution scientifique (voir annexe 5) est l'aboutissement d'une démarche réfléchie et parfois remise en cause par d'après discussions scientifiques et techniques. Elle a contribué à afficher une démarche scientifique à la charnière de deux domaines tant au niveau de l'analyse

d'image qu'au niveau de l'analyse biologique puisqu'une publication applicative est en cours de rédaction.

Bibliographie

- [1] Y.-W. Chen et P.-J. Chiang, « Automatic Cell Counting for Hemocytometers through Image Processing », p. 4, 2011.
- [2] R. Haidar, « Antoni van Leeuwenhoek », *Photoniques*, n° 82, p. 19-24, 2016.
- [3] T. D. Brock, *Milestones in Microbiology; 1546 to 1940*. ASM Press, Washington, DC, 1999.
- [4] R. Koch, « An address on cholera and its bacillus », *Br. Med. J.*, vol. 2, n° 1236, p. 453, 1884.
- [5] L. Pasteur, « Memoire sur la fermentation appelee lactique (Extrait par l'auteur) », *Class. Mol. Med.*, p. 599-601.
- [6] N. Appert, *L'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales...* Patris, 1810.
- [7] V. H. Holsinger, K. T. Rajkowski, et J. R. Stabel, « Milk pasteurisation and safety: a brief history and update », *Rev. Sci. Tech. OIE*, vol. 16, n° 2, p. 441-451, 1997.
- [8] Y. Sanchis, V. Yusà, et C. Coscollà, « Analytical strategies for organic food packaging contaminants », *J. Chromatogr. A*, vol. 1490, p. 22-46, 2017.
- [9] A. Garrido-Maestu, S. Azinheiro, J. Carvalho, et M. Prado, « Rapid and sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol and qPCR », *Food Microbiol.*, vol. 73, p. 254-263, 2018.
- [10] M.-V. Muntean *et al.*, « High Pressure Processing in Food Industry – Characteristics and Applications », *Agric. Agric. Sci. Procedia*, vol. 10, p. 377-383, 2016.
- [11] W. Sitzmann, E. Vorobiev, et N. Lebovka, « Pulsed Electric Fields for Food Industry: Historical Overview », in *Handbook of Electroporation*, D. Miklavcic, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 1-20.
- [12] H. Lei, Y. Hu, et G. Li, « Magnetic poly(phenylene ethynylene) conjugated microporous polymer microspheres for bactericides enrichment and analysis by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry », *J. Chromatogr. A*, vol. 1580, p. 22-29, 2018.
- [13] F. Chemat *et al.*, « Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction », *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 41, p. 357-377, 2017.
- [14] D. Parpas, C. Amaris, J. Sun, K. M. Tsamos, et S. A. Tassou, « Numerical study of air temperature distribution and refrigeration systems coupling for chilled food processing facilities », *Energy Procedia*, vol. 123, p. 156-163, 2017.
- [15] M. A. Vélez, M. C. Perotti, E. R. Hynes, et A. M. Gennaro, « Effect of lyophilization on food grade liposomes loaded with conjugated linoleic acid », *J. Food Eng.*, vol. 240, p. 199-206, 2019.
- [16] M. C. Stanger *et al.*, « Phenolic compounds content and antioxidant activity of 'Galaxy' apples stored in dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen conditions », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 144, p. 70-76, 2018.
- [17] L. Sun, P. B. Pope, V. G. H. Eijsink, et A. Schnürer, « Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure: Community structure during anaerobic digestion », *Microb. Biotechnol.*, vol. 8, n° 5, p. 815-827, 2015.
- [18] R. Zhang *et al.*, « Salting-in effect on muscle protein extracted from giant squid (*Dosidicus gigas*) », *Food Chem.*, vol. 215, p. 256-262, 2017.

- [19] J. J. Devoyod, G. Bret, et J. E. Auclair, « La flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage », *Le Lait*, vol. 48, n° 479-480, p. 613-629, 1968.
- [20] J. Falquet et J. P. Hurni, *Spiruline: aspects nutritionnels*. Flamant vert, 1986.
- [21] J. Wanner et P. Grau, « Identification of filamentous microorganisms from activated sludge: A compromise between wishes, needs and possibilities », *Water Res.*, vol. 23, n° 7, p. 883-891, 1989.
- [22] J. M. Mathara, U. Schillinger, P. M. Kutima, S. K. Mbugua, et W. H. Holzapfel, « Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, n° 3, p. 269-278, 2004.
- [23] M.-E. Bougnoux, C. Angebault, J. Leto, et J.-L. Beretti, « Identification des levures par spectrométrie de masse de type maldi-tof », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2013, n° 450, p. 63-69, 2013.
- [24] W. J. Wilson, C. L. Strout, T. Z. DeSantis, J. L. Stilwell, A. V. Carrano, et G. L. Andersen, « Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology », *Mol. Cell. Probes*, vol. 16, n° 2, p. 119-127, 2002.
- [25] K. Hibar, M. Daami-Remadi, F. Ayed, et M. El-Mahjoub, « Fusarium crown and root rot of tomato and its chemical control », *Int J Agric Res*, vol. 2, p. 687-695, 2007.
- [26] R. R. Guillard et M. S. Sieracki, « Counting cells in cultures with the light microscope », *Algal Cult. Tech.*, p. 239-252, 2005.
- [27] M. Masse, C. Naegelen, N. Pellegrini, J. Segier, N. Marpoux, et F. Beaujean, « Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets », *Transfusion (Paris)*, vol. 32, n° 6, p. 565-571, 1992.
- [28] H. an. K. Davey, « Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses », *Microbiol Rev*, vol. 60, n° 4, p. 641, 1996.
- [29] G. Sharma et R. Bala, *Digital color imaging handbook*. CRC press, 2002.
- [30] R. C. Sproull, « Color matching in dentistry. Part II. Practical applications of the organization of color », *J. Prosthet. Dent.*, vol. 29, n° 5, p. 556-566, 1973.
- [31] J. Abdul, « The Shannon Sampling Theorem—Its Various Extensions and Applications: A », *Proc. IEEE*, vol. 65, n° 11, p. 1565, 1977.
- [32] Hui Tian, B. Fowler, et A. E. Gamal, « Analysis of temporal noise in CMOS photodiode active pixel sensor », *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 36, n° 1, p. 92-101, janv. 2001.
- [33] H. Bilhan et R. Chandrasekaran, *Optical black and offset correction in CCD signal processing*. Google Patents, 2004.
- [34] G. S. Dawe, J.-T. Schantz, M. Abramowitz, M. W. Davidson, et D. W. Hutmacher, « Light microscopy », *Tech. Microsc. Biomed. Appl.*, vol. 2, p. 9, 2006.
- [35] M. W. Davidson et M. Abramowitz, « Optical microscopy », *Encycl. Imaging Sci. Technol.*, 2002.
- [36] E. Hecht, *Optics*. Pearson Education, 2017.
- [37] D. J. Stephens, « Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging », *Science*, vol. 300, n° 5616, p. 82-86, 2003.
- [38] R. Carriles *et al.*, « Invited Review Article: Imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy », *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 80, n° 8, p. 081101, 2009.
- [39] L. Macaire et S. Philipp-Foliguet, « Segmentation d'images couleur », *Actes L'Ecole D'Hiver Sur L'Image Numer. Coul.*, vol. 1, 2004.
- [40] P. Bolon *et al.*, *Analyse d'images: filtrage et segmentation*. Masson, 1995.

- [41] Q. Wang et P. M. Atkinson, « The effect of the point spread function on sub-pixel mapping », *Remote Sens. Environ.*, vol. 193, p. 127-137, 2017.
- [42] G. C. Holst et T. S. Lomheim, *CMOS/CCD sensors and camera systems*. 2007.
- [43] A. Buades, B. Coll, et J. M. Morel, « A Review of Image Denoising Algorithms, with a New One », *Multiscale Model. Simul.*, vol. 4, n° 2, p. 490-530, 2005.
- [44] P. Gervais, P. A. Marechal, et P. Molin, « Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 40, n° 11, p. 1435-1439, 1992.
- [45] P. Gervais, P. Molin, P. A. Marechal, et C. Herail-Foussereau, « Thermodynamics of yeast cell osmoregulation: Passive mechanisms », *J. Biol. Phys.*, vol. 22, n° 2, p. 73-86, 1996.
- [46] P. Gervais et I. M. de Marañon, « Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, vol. 1235, n° 1, p. 52-56, 1995.
- [47] Y. Mille, J.-P. Obert, L. Beney, et P. Gervais, « New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 88, n° 1, p. 71-76, 2004.
- [48] D. S. W. Protter et R. Parker, « Principles and Properties of Stress Granules », *Trends Cell Biol.*, vol. 26, n° 9, p. 668-679, 2016.
- [49] R. N. Bracewell et R. N. Bracewell, *The Fourier transform and its applications*, vol. 31999. McGraw-Hill New York, 1986.
- [50] J. W. Cooley et J. W. Tukey, « An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series », *Math. Comput.*, vol. 19, n° 90, p. 297, 1965.
- [51] P. V. Hough, *Method and means for recognizing complex patterns*. Google Patents, 1962.
- [52] J. Illingworth et J. Kittler, « A survey of the Hough transform », *Comput. Vis. Graph. Image Process.*, vol. 44, n° 1, p. 87-116, 1988.
- [53] R. O. Duda, P. E. Hart, et D. G. Stork, *Pattern Classification (2nd ed.)*. 2017.
- [54] P. Kovsesi, « Phase preserving denoising of images », *signal*, vol. 4, n° 1, p. 212-217, 1999.
- [55] J. Portilla et E. P. Simoncelli, « A Parametric Texture Model Based on Joint Statistics of Complex Wavelet Coefficients », *Int. J. Comput. Vis.*, vol. 1, n° 40, p. 49-71, 2000.
- [56] L. I. Voicu, « Practical considerations on color image enhancement using homomorphic filtering », *J. Electron. Imaging*, vol. 6, n° 1, p. 108, 1997.
- [57] E. Denimal, « Détection de formes compactes en imagerie: développement de méthodes cumulatives basées sur l'étude des gradients: Applications à l'agroalimentaire », Université Bourgogne Franche-Comté, 2018.
- [58] J. Canny, « A computational approach to edge detection », *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, n° 6, p. 679-698, 1986.
- [59] J. E. Bresenham, « Algorithm for computer control of a digital plotter », *IBM Syst. J.*, vol. 4, n° 1, p. 25-30, 1965.
- [60] F. Giavazzi, P. Edera, P. J. Lu, et R. Cerbino, « Image windowing mitigates edge effects in Differential Dynamic Microscopy », *Eur. Phys. J. E*, vol. 40, n° 11, 2017.
- [61] A. Marin, E. Denimal, S. Guyot, L. Journaux, et P. Molin, « A robust generic method for grid detection in white light microscopy Malassez blade images in the context of cell counting », *Microsc Microanal.*, vol. 21, p. 239-248, 2014.
- [62] S. L. Zabell, « On Student's 1908 Article "The Probable Error of a Mean" », *J. Am. Stat. Assoc.*, vol. 103, n° 481, p. 1-7, 2008.
- [63] T. J. Atherton et D. J. Kerbyson, « The Coherent Circle Hough Transform », 1993, p. 27.1-27.10.
- [64] C. Kimme, D. Ballard, et J. Sklansky, « Finding circles by an array of accumulators », *Commun. ACM*, vol. 18, n° 2, p. 120-122, 1975.

- [65] E. R. Davies, « A modified Hough scheme for general circle location », *Pattern Recognit. Lett.*, vol. 7, n° 1, p. 37-43, 1988.
- [66] S. Gupta et S. G. Mazumdar, « Sobel Edge Detection Algorithm », vol. 2, n° 2, p. 6, 2013.
- [67] D. Coeurjolly, « Algorithmique et géométrie discrète pour la caractérisation des courbes et des surfaces », Université Lumière-Lyon II, 2002.
- [68] T. J. Atherton et D. J. Kerbyson, « Size invariant circle detection », *Image Vis. Comput.*, vol. 17, n° 11, p. 795–803, 1999.
- [69] M. Cicconet, D. Geiger, et M. Werman, « Complex-valued hough transforms for circles », in *Image Processing (ICIP), 2015 IEEE International Conference on*, Québec, Canada, 2015, p. 2801-2804.
- [70] P. Kierkegaard, « A method for detection of circular arcs based on the Hough transform », *Mach. Vis. Appl.*, vol. 5, n° 4, p. 249-263, 1992.
- [71] E. Denimal, A. Marin, S. Guyot, L. Journaux, et P. Molin, « Automatic Biological Cell Counting Using a Modified Gradient Hough Transform », *Microsc. Microanal.*, vol. 23, n° 1, p. 11-21, 2017.
- [72] J. Illingworth et J. Kittler, « The adaptive Hough transform », *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, n° 5, p. 690-698, 1987.
- [73] P. Jaccard, « Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura », *Impr. Corbaz Comp*, 1901.
- [74] I. Asimov, *The caves of steel*, vol. 2. Spectra, 2011.
- [75] E. Denimal, A. Marin, S. Guyot, L. Journaux, et P. Molin, « Reliable Detection and Smart Deletion of Malassez Counting Chamber Grid in Microscopic White Light Images for Microbiological Applications », *Microsc Microanal*, vol. 21, p. 886–892, 2015.
- [76] H. Hotelling, « Analysis of a complex of statistical variables into principal components. », *J. Educ. Psychol.*, vol. 24, n° 6, p. 417, 1933.
- [77] G. G. Stokes, « On the change of refrangibility of light », *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, n° 142, p. 463-562, 1852.
- [78] M. Göppert-Mayer, « Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen », *Ann. Phys.*, vol. 401, n° 3, p. 273-294, 1931.
- [79] W. Denk, J. H. Strickler, et W. W. Webb, « Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy », *Sci. New Ser.*, vol. 248, n° 4951, p. 73-76, 1990.
- [80] P. Cochard, « La microscopie multiphotonique : l'imagerie dans l'infrarouge ».
- [81] S. Selvarajah et S. R. Kodituwakku, « Analysis and Comparison of Texture Features for Content Based Image Retrieval », vol. 2, n° 1, p. 6, 2011.
- [82] F. Tomita et S. Tsuji, *Computer analysis of visual textures*, vol. 102. Springer Science & Business Media, 2013.
- [83] G. R. Cross et A. K. Jain, « Markov Random Field Texture Models », *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. PAMI-5, n° 1, p. 25-39, 1983.
- [84] S. Liapis et G. Tziritas, « Color and texture image retrieval using chromaticity histograms and wavelet frames », *IEEE Trans. Multimed.*, vol. 6, n° 5, p. 676-686, 2004.
- [85] F. Truchetet et O. Laligant, « Wavelets in industrial applications: a review », in *Wavelet Applications in Industrial Processing II*, 2004, vol. 5607, p. 1-15.
- [86] J. Bossu, C. Gée, G. Jones, et F. Truchetet, « Wavelet transform to discriminate between crop and weed in perspective agronomic images », *Comput. Electron. Agric.*, vol. 65, n° 1, p. 133-143, 2009.
- [87] J.-P. Gauthier, G. Bornard, et M. Silbermann, « Motions and Pattern Analysis: Harmonic Analysis on Motion Groups and Their Homogeneous Spaces », *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, p. 159-172, 1991.

- [88] F. Smach, C. Lemaître, J.-P. Gauthier, J. Miteran, et M. Atri, « Generalized Fourier Descriptors with Applications to Objects Recognition in SVM Context », *J. Math. Imaging Vis.*, vol. 30, n° 1, p. 43-71, 2008.
- [89] R. M. Haralick, « Statistical and structural approaches to texture », *Proc. IEEE*, vol. 67, n° 5, p. 786–804, 1979.
- [90] Seung-Jin Ryu, M. Kirchner, Min-Jeong Lee, et Heung-Kyu Lee, « Rotation Invariant Localization of Duplicated Image Regions Based on Zernike Moments », *IEEE Trans. Inf. Forensics Secur.*, vol. 8, n° 8, p. 1355-1370, 2013.
- [91] P. Brodatz, *Textures: a photographic album for artists and designers*. Dover Pubns, 1966.
- [92] E. Azoulay, G. Auliac, et J. Avignant, « Mathématiques, DEUG sciences, deuxième année. T. 4. Cours et exercices résolus. »
- [93] D. François, V. Wertz, et M. Verleysen, « Non-Euclidean metrics for similarity search in noisy datasets. », in *ESANN*, Bruges, 2005, p. 339-344.
- [94] P. C. Mahalanobis, « On the generalized distance in statistics », 1936.
- [95] W. L. Martinez et A. R. Martinez, *Computational statistics handbook with MATLAB*. Chapman and Hall/CRC, 2007.
- [96] G. Saporta, *Probabilités, analyse des données et statistique*. Editions Technip, 2006.
- [97] J.-P. Benzécri, *L'analyse des données*, vol. 2. Dunod Paris, 1973.
- [98] S. Tufféry, *Data mining et statistique décisionnelle: l'intelligence des données*. Editions Technip, 2012.
- [99] J. MacQueen, « Some methods for classification and analysis of multivariate observations », in *Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability*, 1967, vol. 1, p. 281-297.
- [100] E. Diday, « Une nouvelle méthode en classification automatique et reconnaissance des formes la méthode des nuées dynamiques », *Rev. Stat. Appliquée*, p. 16, 1971.
- [101] L. Kaufman et P. J. Rousseeuw, *Finding groups in data: an introduction to cluster analysis*, vol. 344. John Wiley & Sons, 2009.
- [102] Y. LeCun, Y. Bengio, et G. Hinton, « Deep learning », *Nature*, vol. 521, n° 7553, p. 436-444, 2015.
- [103] S. L. Salzberg, « C4.5: Programs for Machine Learning by J. Ross Quinlan. Morgan Kaufmann Publishers, Inc., 1993 », *Mach. Learn.*, vol. 16, n° 3, p. 235-240, 1994.
- [104] G. Burel, « Réseaux de neurones en traitement d'images - Des Modèles théoriques aux Applications Industrielles - », 1991.
- [105] V. Vapnik, *The nature of statistical learning theory*. Springer science & business media, 2013.
- [106] M. Sokolova et G. Lapalme, « A systematic analysis of performance measures for classification tasks », *Inf. Process. Manag.*, vol. 45, n° 4, p. 427-437, 2009.
- [107] Y. Sasaki, « The truth of the F-measure », 2007.
- [108] H. Delacour, A. Servonnet, A. Perrot, J. F. Vigezzi, et J. M. Ramirez, « La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique », *Ann Biol Clin*, vol. 63, p. 10, 2019.
- [109] S. Guyot, P. Gervais, M. Young, P. Winckler, J. Dumont, et H. M. Davey, « Surviving the heat: heterogeneity of response in *Saccharomyces cerevisiae* provides insight into thermal damage to the membrane: Monitoring response of yeast plasma membrane to heat stress », *Environ. Microbiol.*, vol. 17, n° 8, p. 2982-2992, 2015.
- [110] L. Breiman, « Bagging predictors », *Mach. Learn.*, vol. 24, n° 2, p. 123-140, 1996.
- [111] L. Breiman, *Classification and regression trees*. Routledge, 2017.
- [112] D. Coomans, « Nearest Neighbour Classification by using Alternative Voting Rules », *Anal. Chim. Acta*, n° 136, p. 15-27, 1982.

- [113] J. Li, J. M. Bioucas-Dias, et A. Plaza, « A new subspace discriminant analysis approach for supervised hyperspectral image classification », in *2011 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium*, Vancouver, BC, Canada, 2011, p. 3911-3914.
- [114] C. Cortes et V. Vapnik, « Support-vector networks », *Mach. Learn.*, vol. 20, n° 3, p. 273-297, 1995.
- [115] J. W. Hwang et H. S. Lee, « Adaptive image interpolation based on local gradient features », *IEEE Signal Process. Lett.*, vol. 11, n° 3, p. 359-362, 2004.
- [116] N. OTSU, « A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms », *IEE Trans. Syst. Man Cybern.*, vol. 9, n° 1, p. 5, 1979.
- [117] L. Vincent et P. Soille, « Watersheds in Digital Spaces: An Efficient Algorithm Based on Immersion Simulations », *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 13, n° 6, p. 16, 1991.
- [118] A. Haas, G. Matheron, et J. Serra, « Morphologie mathématique et granulométries en place », in *Annales des mines*, 1967, vol. 11, p. 7.3.
- [119] N. Combaret et H. Talbot, « Robust 3D segmentation of composite materials fibres », in *International Symposium on Mathematical Morphology-International Symposium on Mathematical Morphology*, Rio de Janeiro, Brésil, 2007, vol. 7, p. 25-26.
- [120] S. Gesbert, V. Howard, D. Jeulin, et F. Meyer, « The use of basic morphological operations for 3D biological image analysis », *Trans Roy Microsc Soc*, vol. 1, p. 293-296, 1990.
- [121] F. Meyer, « Cytologie quantitative et morphologie mathématiques », 1979.
- [122] S. Valero, J. Chanussot, J. A. Benediktsson, H. Talbot, et B. Waske, « Advanced directional mathematical morphology for the detection of the road network in very high resolution remote sensing images », *Pattern Recognit. Lett.*, vol. 31, n° 10, p. 1120-1127, 2010.
- [123] E. R. Dougherty et R. A. Lotufo, *Hands-on morphological image processing*, vol. 59. SPIE press, 2003.
- [124] P. Soille, *Morphological image analysis: principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [125] L. Calabi et W. E. Hartnett, « Shape recognition, prairie fires, convex deficiencies and skeletons », *Am. Math. Mon.*, vol. 75, n° 4, p. 335-342, 1968.
- [126] R. M. Haralick et K. Shanmugam, « Textural features for image classification », *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, n° 6, p. 610-621, 1973.
- [127] L. Beney, I. Martínez de Marañón, P.-A. Marechal, et P. Gervais, « Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 55, n° 1-3, p. 275-279, 2000.
- [128] I. Martinez de Mara on, P. Gervais, et P. Molin, « Determination of cells' water membrane permeability: unexpected high osmotic permeability of *Saccharomyces cerevisiae* », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 56, p. 62-70, 1997.

Annexes

Annexe 1 : Morphologie mathématiques

La morphologie mathématique [57] est une théorie développée autour d'un ensemble de techniques mathématiques et informatiques. Elle décrit les fondements de fonctions utilisées en analyse d'images dont le but est l'étude des objets, de leur forme, de leur taille, des relations avec leur voisinage (en particulier topologiques), de leur texture, et de leurs niveaux de gris ou de leur couleur. Elle a été développée initialement dans un cadre ensembliste, et donc avec des applications directes pour les images en noir et blanc.

G. Matheron introduit la morphologie mathématique dans les années 1960 pour l'étude des matériaux poreux [118], elle fournit de nombreux outils reposant sur un ensemble de transformations non linéaires pour la reconnaissance des formes. Elle est souvent employée dans le cadre du traitement d'images pour des applications telles que le filtrage, la segmentation, les mesures, ou bien l'analyse de texture. Depuis elle a prouvé depuis son utilité dans différentes applications dans de nombreux domaines du traitement d'images, aussi bien 2D que 3D [119] en biologie [120], cytologie quantitative [121], en imagerie médicale, en imagerie aérienne et satellitaire [122], etc.

Les opérations morphologiques sont des types de traitement dans lequel les limites géométriques des objets sont modifiées. La morphologie mathématique est basée sur la théorie des ensembles, chaque opération de traitement peut être définie comme une succession d'unions et d'intersections d'ensembles [123], [124]. Dans les sections suivantes, afin de présenter les principaux outils avec un point de vue très opérationnel, nous n'entrerons pas dans les détails de la théorie.

a. L'image binaire.

Une image I peut être considérée comme une fonction f de l'espace $E = \mathbb{Z} \times \mathbb{Z} = \mathbb{Z}^2$ dans \mathbb{R}^n . pour une image monochrome, $n = 1$, pour une image couleur $n = 3$ et pour les images multispectrales $n > 3$. Dans le cas d'une image binaire, n vaut 1 et les valeurs possibles sont limitées à 0 ou 1. Dans le cadre de notre étude, nous nous limiterons à la présentation des outils pour $n = 1$.

Soit A et B deux régions complémentaires dans une image binaire en noir et blanc. A et B peuvent être considérés comme deux ensembles tels que $I = A \cup B$ et $A \cap B = \emptyset$, et leurs composants $a = (a_1, a_2) \in A$ et $b = (b_1, b_2) \in B$ sont les pixels à l'intérieur de chaque région. Nous nommons A l'objet à étudier (la forme) et B le fond de l'image tel que

$$A = \{a | f(a) = 1\}$$

$$B = \{b | b \notin A, f(b) = 0\}$$

La forme A peut représenter un ou plusieurs objets (notion de composante connexe); certaines composantes du fond B peuvent alors représenter des trous dans les objets (notion de simple connexité, voir figure 154).

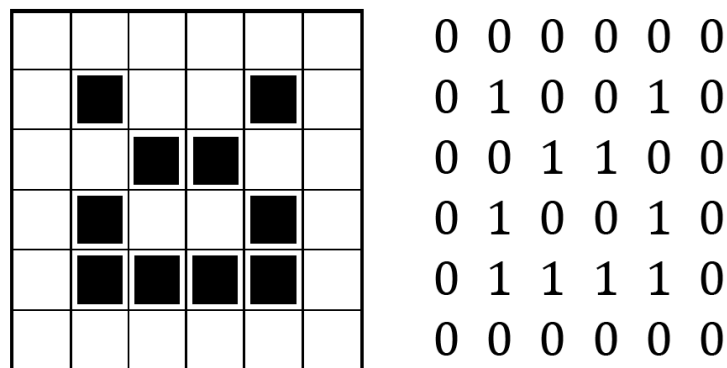


figure 154: image binaire et sa représentation chiffrée

Nous pouvons ensuite définir quelques opérateurs élémentaires pour manipuler et extraire des informations de ces images binaires.

b. La translation

La translation de A par $x = (x_1, x_2)$ pixels comme :

$$A_x = \{c | c = a + x \text{ pour tous } a \in A\}$$

avec

$$c = c(c_1, c_2) = (a_1 + x_1, a_2 + x_2) = a + x$$

c. La réflexion

La réflexion de A se définit comme :

$$\check{A} = \{G - a | a \in A\}$$

La réflexion s'entend autour d'un point d'origine G .

d. La complémentation

Le complémentaire de A :

$$A^c = \{c \mid c \notin A\}$$

e. La différence

La différence $A-B$ s'écrit :

$$A - B = A \cap B^c$$

f. L'élément structurant.

L'élément structurant est un objet binaire de E . Il est utilisé par certains opérateurs de morphologie mathématique. L'élément structurant définit un voisinage autour de chaque point de l'image. La notion d'élément structurant est introduite de manière à permettre d'opérer au niveau local dans l'image. Il joue le rôle de modèle local, ou de sonde. Il est déplacé en chaque point de l'image à traiter. Pour chaque position on étudie sa relation avec l'image binaire, qui peut être du type « est inclus dans l'ensemble », ou « touche l'ensemble », par exemple.

Si S est un élément structurant, tous les éléments $s \in S$ sont repérés à partir de l'origine $(0,0)$ de S située en son centre. L'élément structurant peut prendre plusieurs formes : carré, ligne, disque, etc.

Si S est un carré de 5×5

$$s = (s_1, s_2) \mid -2 \leq s_1, s_2 \leq 2$$

Cet élément structurant est donc déplacé de façon à ce que son origine passe par tous les points de l'ensemble I . Pour chaque point, la question relative à l'union, à l'intersection ou à l'inclusion de S dans A est posée. La réponse sera positive ou négative. L'image des points correspondants à des réponses positives forme un nouvel ensemble qui constitue l'image transformée voir la figure 155

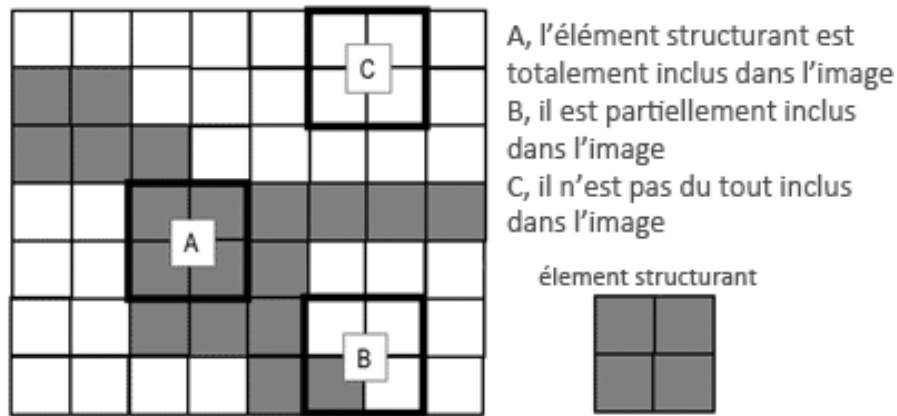


figure 155: Trois possibilités de réponse au test de l'élément structurant

g. Opérateurs de base et leurs combinaisons

i. La dilatation

La dilatation morphologique de A avec l'élément structurant S peut être définie comme la somme de Minkowski de A par le symétrique \check{S} de S ou bien de façon plus intuitive:

$$\delta_S(A) = A \oplus \check{S} = \{x \in I / S_x \cap A \neq \emptyset\}$$

La dilatation peut également se définir [125] en posant la question : Est-ce que l'élément structurant S touche l'objet A ? Les positions de S dans I qui peuvent répondre par l'affirmative font partie de l'image « dilatée » voir la figure 156.

Les effets attendus sur l'image seront les suivants : tous les objets vont "grossir" d'une fraction de la taille de l'élément structurant ; s'il existe des trous dans les objets, c'est-à-dire des éléments de fond à l'intérieur des objets, ils seront partiellement ou totalement comblés; si des objets sont séparés d'une distance moins grande que la taille de l'élément structurant, ils seront fusionnés.

La dilatation morphologique n'est pas (sauf cas très particulier) inversible. L'opération dite inverse de la dilatation est l'érosion morphologique.

ii. L'érosion

L'érosion peut se définir [124] en posant la question : Est-ce que le translaté de l'élément structurant S est inclus dans l'objet A . Les positions de S dans I qui peuvent répondre par l'affirmative font partie de l'image « érodée », voir la figure 156.

L'érosion se définit alors comme :

$$\varepsilon_S(A) = A \ominus \check{S} = \{x \in I \mid S_x \subset A\}$$

Les effets attendus sur l'image seront : les objets de taille inférieure à celle de l'élément structurant vont disparaître; les autres objets seront érodés d'une partie correspondant une fraction de la taille de l'élément structurant; s'il existe des trous dans les objets, c'est à dire des éléments de fond à l'intérieur des objets, ils seront agrandis; les objets reliés entre eux par des ponts d'une taille inférieure à S seront séparés.

L'érosion en traitement d'image permet entre autres de faire disparaître les petits artefacts.

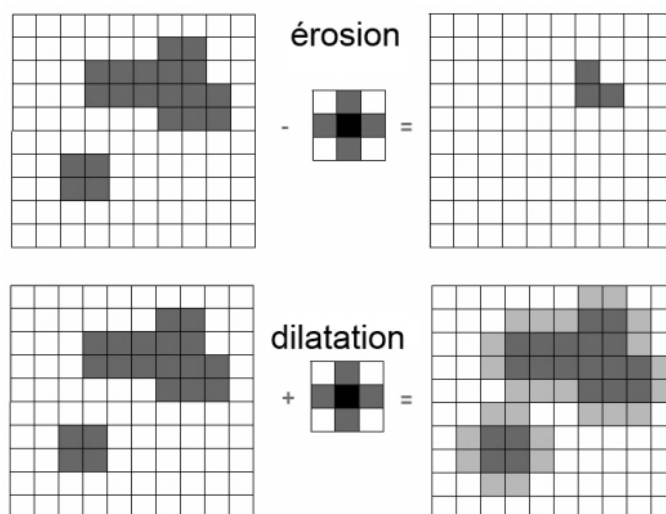


figure 156 Effet de l'érosion et de la dilatation par un élément structurant avec en noir son pixel d'origine (0,0).

iii. L'ouverture

La composition d'une dilatation morphologique avec l'érosion par le même élément structurant ne produit pas, en général, l'identité, mais deux autres opérateurs morphologiques, l'ouverture et la fermeture morphologique selon l'ordre de la composition.

L'ouverture consiste donc en une érosion suivie d'une dilatation, voir la figure 157.

$$\gamma_S(A) = \delta_S(\varepsilon_S(A)) = (A \ominus \check{S}) \oplus \check{S}.$$

Les principaux effets attendus sur l'image sont : la suppression des petits artefacts et la disparition des liens étroits entre deux zones compactes

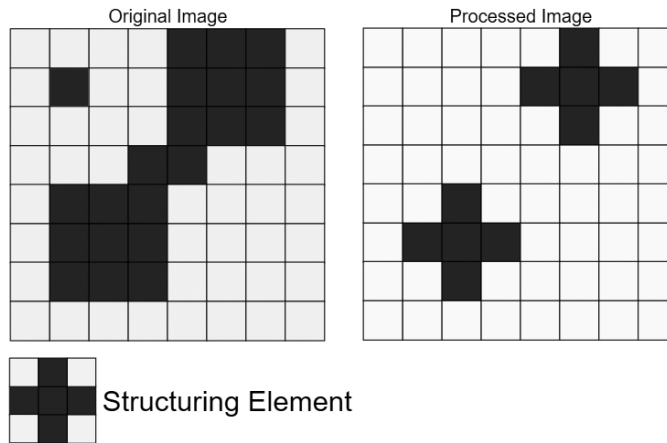


figure 157 résultat d'une ouverture.

iv. La fermeture

La fermeture est le pendant de l'ouverture. Les opérations se font dans l'ordre inverse : une dilatation suivie d'une érosion (figure 158).

$$\phi_S (A) = \varepsilon_S(\delta_S(A)) = (A \oplus \check{S}) \ominus \check{S}.$$

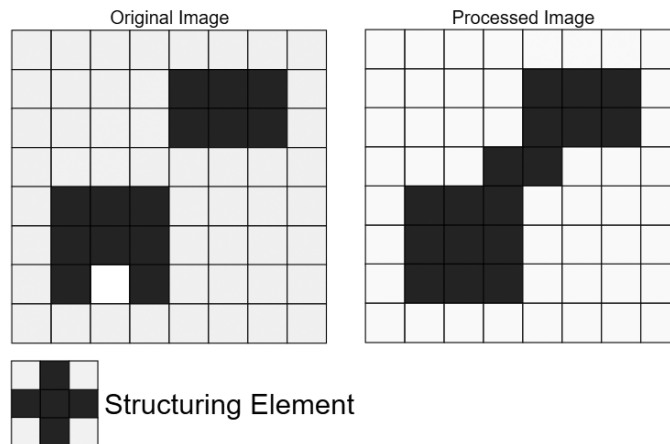


figure 158 Résultat d'une fermeture

Les principaux effets attendus sur l'image sont : la suppression des petits trous et la fusion des zones compactes peu éloignées.

v. La squelettisation

La squelettisation [125] est une étape essentielle de la reconnaissance de forme. Elle a pour but de décrire chaque objet par un ensemble de lignes « infiniment » fines dans \mathbb{Z}^2 (1 pixel de large) et correspondant au squelette de l'objet, réduisant ainsi sensiblement le volume d'information à manipuler. Le squelette a plusieurs définitions qui donnent des résultats à peu près équivalents.

Il est généralement défini comme étant l'ensemble des lignes médianes de A , c'est-à-dire l'ensemble des points équidistants de deux points de la frontière. La frontière de A est l'ensemble des points de A ayant au moins un voisin (notion de connectivité 4 ou 8) non élément de A , voir la figure 159.

Le squelette peut être calculé par la méthode dite des boules maximales : la boule maximale autour d'un point a de A est le plus grand cercle centré en a inclus dans A . Le squelette de A est alors le lieu des centres des boules maximales intérieurement tangentes à la surface de A . On parle de boules, car la méthode peut être extrapolée dans la troisième dimension, mais dans le cas des images binaires, nous utilisons des cercles.

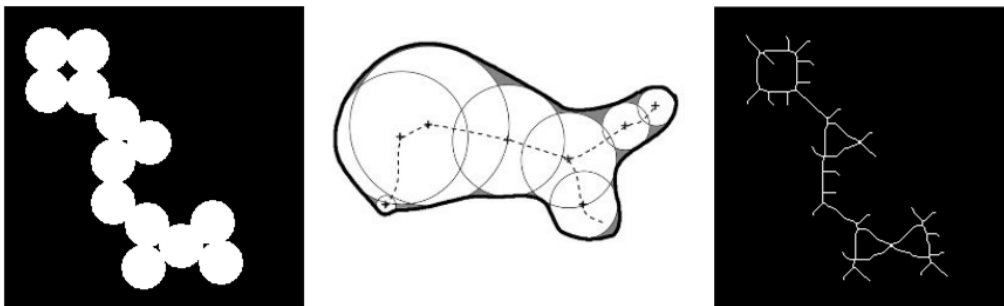


figure 159 principe de la squelettisation. À gauche Image binaire, au centre, illustration de l'algorithme de la boule maximale, à droite le squelette correspondant à l'image binaire de gauche.

vi. Le « Hole filling »

Le « hole filling » est une étape souvent primordiale dans le traitement d'image. Il permet comme son nom l'indique de remplir les trous dans les objets de l'image. Il peut servir à éliminer des trous de différentes formes ou tailles en fonction de l'élément structurant utilisé. figure 160. Mathématiquement, il peut se décrire comme la suite d'opérations suivantes [124] :

$$X^k = (X^{k-1} \oplus S) \cap A^c, \text{ pour } k = 1, 2, 3, \dots, k-1$$

Avec S l'élément structurant et A^c le complémentaire de l'objet A contenant le trou à boucher et X^0 le point de départ du remplissage sélectionné à l'intérieur du contour de A .

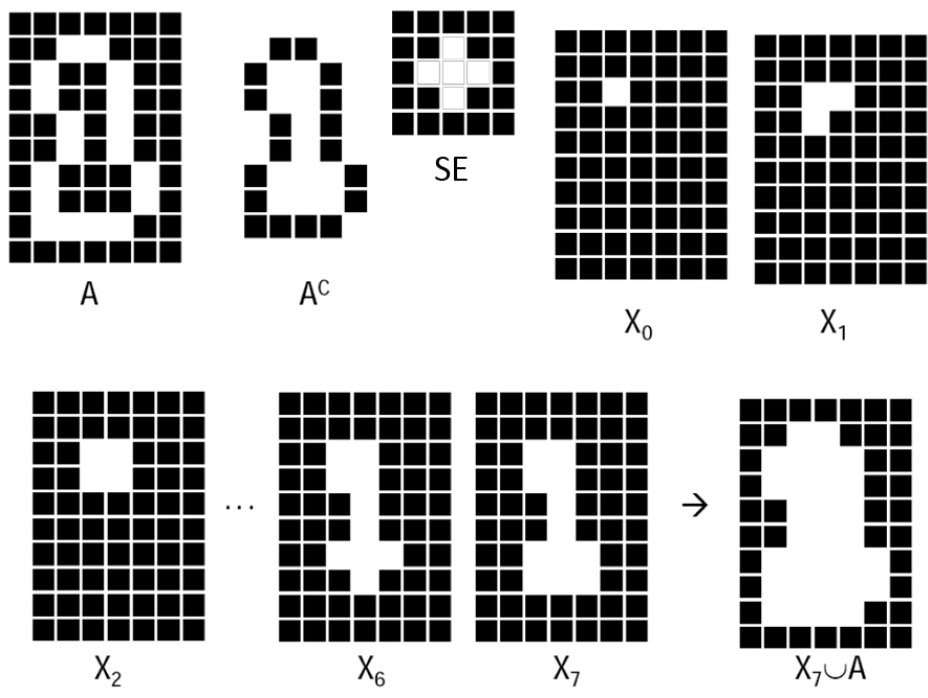


figure 160 Les différentes étapes de l'algorithme de "hole filling" morphologique.

La figure 161 présente l'application de l'algorithme sur le cas concret d'une segmentation de pièces de monnaie.

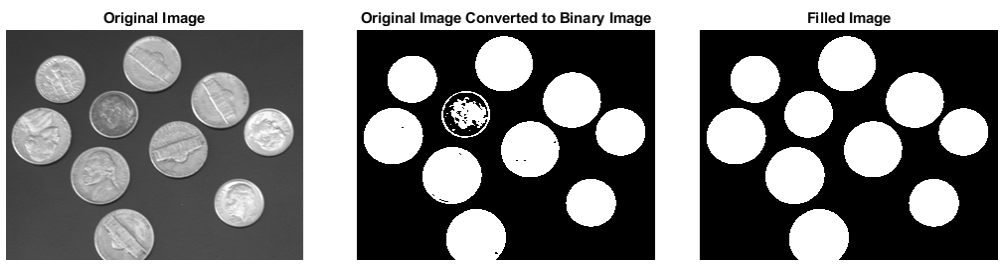


figure 161 Exemple de "hole filling" sur l'image binarisée de pièces de monnaie (d'après matlab ©)

Annexe 2 : précision sur les paramètres de calcul de la transformée de Hough linéaire

Lorsqu'on procède à une transformée de Hough linéaire [57], il est important de prendre garde à effectuer des réglages corrects pour l'ensemble des paramètres. Ce sont ces réglages que nous allons regarder de plus près dans cette annexe :

La figure suivante (figure 162) représente une photographie numérique couleur contenant des alignements. Dans un premier temps, on effectue une détection de contours afin d'obtenir transformée de Hough exploitable, partant du principe qu'il n'y a pas d'alignement de points pertinent hors points de contours. Cette détection de contours est faite à l'aide d'un filtre de Canny [58]. La figure suivante (figure 163) représente les contours déterminés par Canny. Les lignes trouvées par la transformée de Hough sont tracées en surimpression rouge.



figure 162 photo d'un immeuble (exemple tiré de la documentation d'OpenCv³¹)

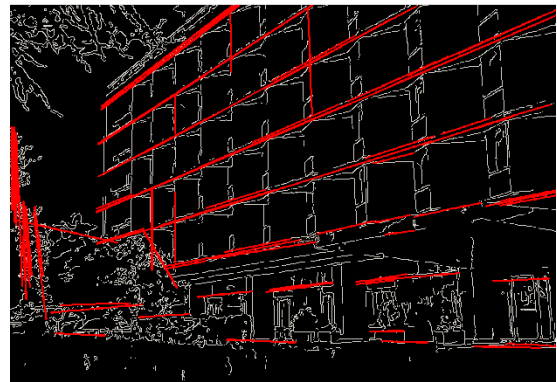


figure 163 Image présentant les contours (en blanc) de l'image originale et les droites détectées grâce à la transformée de Hough linéaire (en rouge)

Il est intéressant de remarquer dans ce résultat que toutes les lignes perçues par notre « cerveau » ne sont pas représentées. Cela peut être dû à de nombreux facteurs. En premier, les réglages et les choix de discrétisations de l'espace des paramètres influent beaucoup sur le résultat final de la méthode. La sensibilité de ces réglages est un élément de performance auquel nous devons être attentifs.

³¹ http://docs.opencv.org/2.4/modules/imgproc/doc/feature_detection.html?highlight=houghlines

La nature discrète de l'image fait qu'il est très peu probable de pouvoir trouver un ensemble de points parfaitement alignés selon les paramètres d'une droite parfaitement définie. Dans la matrice d'accumulation, cela se traduit par un étalement du lieu d'intersection des sinusoides.

La valeur maximum de la matrice d'accumulation représente le plus grand alignement de pixels détecté dans l'image. Il s'agit ensuite de détecter itérativement les autres alignements. Le passage au maximum suivant nécessite de supprimer le maximum précédent et l'étalement pousse à déterminer un voisinage d'exclusion pour chaque maximum afin d'éviter de détecter à plusieurs reprises une même droite. En règle générale, les algorithmes de transformée de Hough propose d'annuler le n^{e} maximum trouvé et son voisinage avant de lancer la recherche du $(n+1)^{\text{e}}$ maximum. La définition de la taille du voisinage influe donc directement sur la capacité de la transformée de Hough à détecter les lignes parallèles rapprochées : plus ce voisinage sera grand, plus les alignements de pixels parallèles devront être éloignés dans l'espace image pour être détectables (figure 164). Ce sont les limites de ce principe de zone d'exclusion qui nous ont poussées à proposer une nouvelle approche pour les passages des pics n à $n+1$ via la méthode de déconstruction.

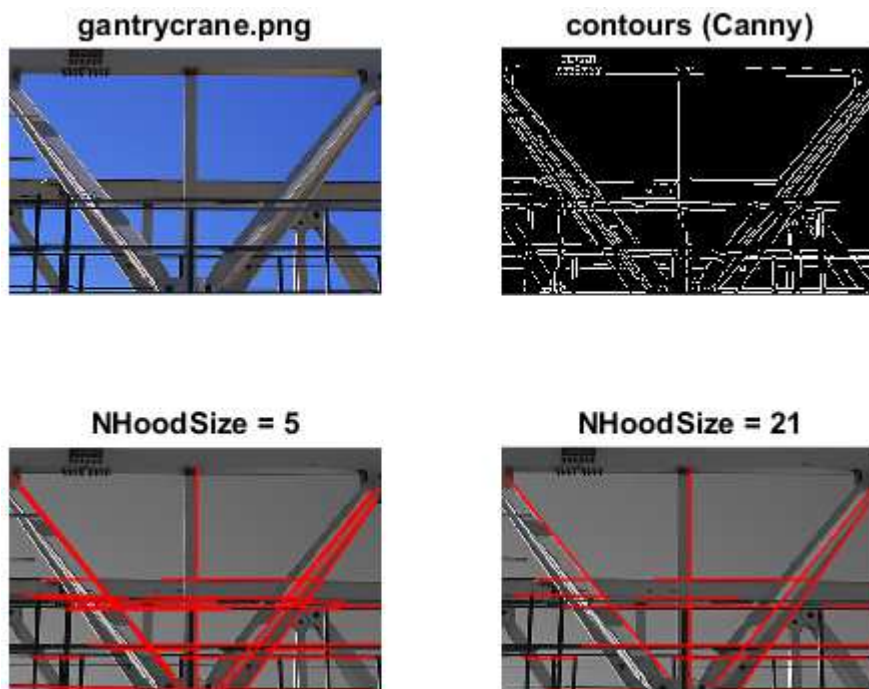

































































































































































figure 164: Comparaison de la discrimination des lignes parallèles en fonction du voisinage d'exclusion dans l'accumulateur









































Annexe 3 : Reproduction du formulaire d'évaluation manuelle du nombre d'agrégats ribo nucléoprotéiques









































			
Photo 100	Photo 101	1010-49-14	1011-49-22
			
1012-49-27	Photo 1012	1013-49-33	1014-49-35
			
1015-49-37	1016-49-39	1017-49-43	1018-49-46
			
1019-50-4	Photo 102	1020-50-9	1021-50-10
			
1022-50-13	1023-50-15	1024-50-16	1025-50-18
			
1026-50-24	Photo 1026	1027-51-6	1028-51-13
			
1029-51-15	Photo 103	Photo 1030	Photo 1050
			
Photo 1062	Photo 1065	Photo 107	Photo 1076
			
Photo 1094	Photo 1105	Photo 1110	Photo 1122
			
Photo 1128	Photo 113	Photo 1145	Photo 1150

			
Photo 1151	Photo 1159	Photo 116	Photo 1165
			
Photo 1170	Photo 1173	Photo 1175	Photo 1182
			
Photo 1196	Photo 1197	Photo 1200	Photo 1208
			
Photo 1209	Photo 1223	Photo 123	Photo 124
			
Photo 1246	Photo 1328	Photo 1334	Photo 1337
			
Photo 1390	Photo 1391	Photo 1398	Photo 140
			
Photo 1419	1420-82-6	Photo 1420	1421-82-7
			
1422-82-9	1423-82-10	1424-82-11	1425-82-12
			
1426-82-13	1427-82-17	1428-82-18	1429-82-19
			
1430-82-21	1431-82-22	1432-82-27	1433-82-31

			
1434-82-34	Photo 1541	Photo 1546	Photo 1629
			
Photo 170	Photo 1707	Photo 1712	Photo 1716
			
Photo 1726	Photo 173	Photo 177	Photo 21
			
Photo 22	Photo 224	Photo 227	Photo 228
			
Photo 23	Photo 234	Photo 238	Photo 24
			
Photo 240	2480-140-4	2481-140-5	2482-140-7
			
2483-140-8	2484-140-10	2485-140-11	2486-140-13
			
2487-140-17	2488-140-20	2489-140-21	Photo 25
			
Photo 252	Photo 26	2650-147-43	2651-147-46
			
2652-147-47	2653-147-53	2654-147-54	2655-147-55

			
2656-147-59	2657-147-61	2658-148-2	2659-148-4
			
Photo 266	Photo 27	Photo 28	Photo 280
			
Photo 30	Photo 310	Photo 314	Photo 316
			
Photo 317	Photo 32	Photo 33	Photo 330
			
Photo 34	Photo 36	Photo 364	Photo 365
			
Photo 366	Photo 38	Photo 381	Photo 388
			
Photo 40	Photo 402	Photo 415	Photo 416
			
Photo 418	Photo 419	Photo 427	Photo 434
			
Photo 436	Photo 438	Photo 44	Photo 446
			
Photo 459	Photo 46	Photo 47	Photo 473

			
Photo 484	Photo 53	Photo 54	Photo 553
			
Photo 56	Photo 57	Photo 58	Photo 580
			
Photo 585	Photo 587	Photo 588	Photo 59
			
Photo 590	Photo 592	Photo 593	Photo 596
			
Photo 602	Photo 604	Photo 608	Photo 61
			
Photo 615	Photo 616	Photo 62	Photo 627
			
Photo 63	Photo 64	Photo 65	Photo 672
			
Photo 68	Photo 687	Photo 70	Photo 71
			
Photo 712	Photo 714	Photo 715	Photo 72
			
Photo 73	Photo 74	Photo 75	Photo 750

			
Photo 78	Photo 82	Photo 824	Photo 83
			
Photo 86	Photo 896	Photo 90	Photo 908
			
Photo 926	Photo 94	Photo 943	Photo 95
			
Photo 96	Photo 972	Photo 976	Photo 979
			
Photo 992	Photo 993	Photo 998	Image046
			
Image047	Image048	Image049	Image050
			
Image051	Image052	Image053	Image054
			
Image055	Image056	Image057	Image058
			
Image059	Image060	Image061	Image062
			
Image063	Image064	Image065	Image066

Annexe 4 : Calcul des paramètres de texture de Haralick

Cette annexe expose le mode de calcul des 14 paramètres texturaux de Haralick [126].

Le détail de calcul de chaque paramètre est donné en se référant à la matrice de cooccurrences

GLCM :

$$GLCM = \begin{bmatrix} p(1,1) & \cdots & p(1,N) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ p(n,1) & \cdots & p(N,N) \end{bmatrix}$$

Où N est le nombre de niveau de gris utilisés.

Les notations suivantes sont utilisées :

$$p_x(i) = \sum_{j=1}^N p(i,j)$$

$$p_y(j) = \sum_{i=1}^N p(i,j)$$

$$\sum_i \dots \equiv \sum_{i=1}^N \dots$$

$$\sum_j \dots \equiv \sum_{j=1}^N \dots$$

$$p_{x+y}(k) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N p(i,j) \quad \text{avec } i + j = k$$

$$p_{x-y}(k) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N p(i,j) \quad \text{avec } |i - j| = k$$

H_X et H_Y sont les entropies (f_9) respectives de p_x et p_y

$$H_{XY} = - \sum_i \sum_j p(i,j) \log\{p(i,j)\}$$

$$HXY1 = - \sum_i \sum_j p(i,j) \log\{p_x(i)p_y(j)\}$$

$$HXY2 = - \sum_i \sum_j p_x(i)p_y(j) \log\{p_x(i)p_y(j)\}$$

1. Angular second moment :

$$f_1 = \sum_i \sum_j \{p(i,j)\}^2$$

2. Contrast :

$$f_2 = \sum_{n=0}^N n^2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N p(i,j) \quad \text{avec } |i-j| = n$$

3. Correlation :

$$f_3 = \frac{\sum_i \sum_j (ij) p(i,j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

avec $\mu_x, \mu_y, \sigma_x, \sigma_y$ les moyennes et variances de p_x et p_y

4. Sum of square ; Variance :

$$f_4 = \sum_i \sum_j (i - \mu)^2 p(i,j)$$

5. Inverse difference moment :

$$f_5 = \sum_i \sum_j \frac{1}{1 + (i-j)^2} p(i,j)$$

6. Sum Average :

$$f_6 = \sum_{i=2}^{2N} i \cdot p_{x+y}(i)$$

7. Sum Variance :

$$f_7 = \sum_{i=2}^{2N} (i - f_8)^2 p_{x+y}(i)$$

8. Sum Entropy :

$$f_8 = \sum_{i=2}^{2N} p_{x+y}(i) \log\{p_{x+y}(i)\}$$

9. Entropy :

$$f_9 = - \sum_i \sum_j p(i, j) \log\{p(i, j)\}$$

10. Difference variance :

$$f_{10} = \text{variance of } p_{x-y}$$

11. Difference entropy :

$$f_{11} = - \sum_{i=2}^{2N} p_{x-y}(i) \log\{p_{x-y}(i)\}$$

12. Information measure of correlation I :

$$f_{12} = \frac{HXY - HXY1}{\max\{HX, HY\}}$$

13. Information measure of correlation II :

$$f_{13} = \sqrt{1 - e^{-2(HXY2 - HXY)}}$$

14. Maximal Correlation Coefficient :

$$f_{14} = \sqrt{\lambda_2} \text{ où } \lambda_2 \text{ est la seconde plus grande valeur propre de } \mathbf{Q}$$

$$\mathbf{Q}(i, j) = \sum_k \frac{p(i, k)p(j, k)}{p_x(i)p_y(k)}$$

Annexe 5 : Importance biologique du stress osmotique et relation avec la cellule

Il existe, en biologie, trois types d'états osmotiques : l'état hypotonique, l'état isotonique, et l'état hypertonique. (figure 165)

Pour la cellule, l'état hypotonique correspond au moment où la concentration en soluté à l'intérieur de la cellule est supérieure à celle du milieu dans lequel elle évolue. La cellule va absorber du liquide extracellulaire, la pression interne augmente, et va éventuellement la faire exploser : c'est la lyse cellulaire.

L'état isotonique correspond au moment où la solution dans la cellule et son environnement sont équitablement concentrées, la taille de la cellule reste stable et ne fluctue pas.

L'état hypertonique correspond au moment où la solution dans la cellule est peu concentrée en soluté par rapport au milieu dans lequel elle est placée, la cellule va libérer de l'eau vers le milieu et la pression interne de la cellule diminue, la taille de la cellule va faire de même. Si trop d'eau est expulsée, la cellule va mourir par plasmolyse.

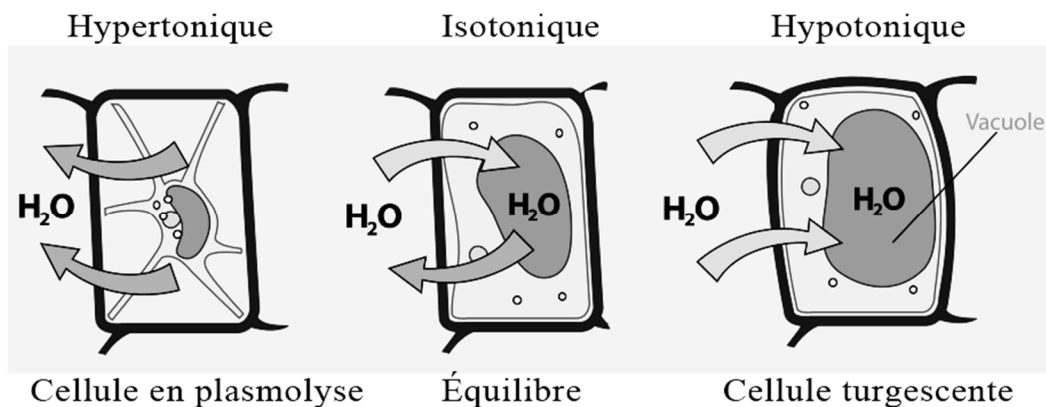


figure 165 Schéma illustrant les relations osmotiques entre une cellule et le milieu extérieur³²

L'étude des cellules soumises à ces différentes conditions de pression osmotique présente un grand intérêt en agroalimentaire [44]. Ce type d'étude intervient notamment en amont dans l'optimisation de procédés de production, de stérilisation ou de conservation des aliments [127].

³² D'après https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Turgor_pressure_on_plant_cells_diagram.svg

Une des données expérimentales primordiales à recueillir lors de ces expériences est le taux de survie des cellules.

i. Pression osmotique et pression hydrostatique

Les cellules telles que les levures maintiennent leur milieu intracellulaire à une pression osmotique légèrement supérieure à celle du milieu extracellulaire [128]. Cette différence dans les pressions osmotiques est définie comme la pression de turgescence ($\Delta P = \Pi_i - \Pi_e$, où i et e représentent respectivement le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire)

La pression osmotique se traduit par une pression mécanique, exerçant une force sur la membrane. Une différence de pression osmotique très grande peut entraîner la rupture de la membrane (cas de la lyse).

À l'inverse, si l'on exerce une pression mécanique (hydrostatique), on peut forcer le passage de solutés à travers la membrane. C'est le principe de l'osmose inverse. L'eau comporte des solutés, particulièrement des sels. Si deux solutions de concentrations différentes sont placées de chaque côté d'une membrane filtre (par exemple la membrane cellulaire), l'eau franchira la membrane par osmose jusqu'à ce que les concentrations s'équilibrent ou que la différence de pression dépasse la pression osmotique (le déplacement d'eau fait diminuer la concentration dans le compartiment où l'eau afflue et la fait augmenter dans le compartiment d'où elle vient). Inversement, en exerçant dans un des compartiments une pression hydrostatique dépassant la pression osmotique, on force l'eau à quitter le compartiment sous pression en dépit de l'augmentation de concentration en soluté qui s'y produit, et de la dilution qui se fait dans l'autre compartiment.

Annexe 6 : Contributions

a. A robust generic method for grid detection in white light microscopy Malassez blade images in context of cell counting

Cet article présente la méthode mise en œuvre pour la détection et la caractérisation de la grille de Malassez.

Nous présentons la problématique liée à la présence de la grille dans les images et l'intérêt de sa caractérisation pour le traitement des problématiques microbiologiques.

Nous détaillons le principe d'identification de la grille par extraction de sa signature dans la transformée de Fourier.

Nous présentons deux résultats distincts : dans un premier temps, le résultat de caractérisation de la grille associée au test de robustesse de la méthode. Puis dans un second temps, nous présentons un premier résultat de comptage de cellules. Pour ce comptage, la segmentation des cellules est effectuée à l'aide d'un seuillage et de méthodes morpho mathématiques ; les résultats obtenus sont acceptables mais demandent à être améliorés, les problématiques soulevées font l'objet du second chapitre de cette thèse mais également d'un autre article publié dans le cadre de nos travaux.

A Robust Generic Method for Grid Detection in White Light Microscopy Malassez Blade Images in the Context of Cell Counting

Ambroise Marin,^{1,2,*} Emmanuel Denimal,^{1,2} Stéphane Guyot,³ Ludovic Journaux,^{2,4} and Paul Molin^{2,3}

¹Service Systèmes d'Information, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

²Groupe Modélisation Numérique en Agronomie et AgroAlimentaire, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

³UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon / Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

⁴Laboratoire Electronique, Informatique et Image, Université de Bourgogne, UFR Sciences et Techniques, allée Alain Savary, 21000 Dijon, France

Abstract: In biology, cell counting is a primary measurement and it is usually performed manually using hemocytometers such as Malassez blades. This work is tedious and can be automated using image processing. An algorithm based on Fourier transform filtering and the Hough transform was developed for Malassez blade grid extraction. This facilitates cell segmentation and counting within the grid. For the present work, a set of 137 images with high variability was processed. Grids were accurately detected in 98% of these images.

Key words: Malassez, Fourier transform, Hough transform, morphological mathematics, cell segmentation, image analysis

INTRODUCTION

In biology, cell counting is a primary measurement. In the context of microscopy research, the Malassez blade is used in the eyepiece of a microscope to determine cell concentration (Hibar, 2007). The volume of solution is calibrated in the Malassez counting chamber, enabling an extrapolation of the number of observed cells in terms of cell concentration in the whole solution. In other words, since grid dimensions are well known, cells counted within the grid directly determine cell concentration in the solution. Hence, precise grid detection allows the determination of a region of interest (ROI) without previous knowledge of image acquisition parameters such as magnification or field of view.

The counting operation is quite tedious, and in recent years, the evolution of numerical devices associated with microscopes has made it possible to automate cell counting by means of image acquisition and processing. In this application, certain industrial devices work well for a standardized series of acquisitions and can be used successfully in cell counting. Nevertheless, in the research laboratory environment, high variability in experimental conditions makes computer image processing less successful. For example, when one uses solutes in the culture medium, the added solute may change the diffraction properties of the medium, thus rendering the image unusable for computer processing. Unfortunately, a serious limitation is linked to the presence of the Malassez grid of the

counting chamber, which may be an obstacle to counting because cells may be confused with the grid by the image processing algorithms, such as thresholding or other segmentation methods. As a result, the presence of the grid in a processed image can lead to false cell detection.

In this context, several attempts to design an automated method to identify and remove the Malassez grid have been undertaken. Chen (2011) proposed a solution based on morphological mathematics which finds a grid and counts cells within it. We tried this algorithm on images from our laboratory. Almost all of the results were unsuccessful due to the high variability and structure in the representation by pixels of the Malassez grid. The algorithm described in Chen (2011) is only able to recognize a grid as a very narrow range of uniform pixel combinations. It also appears that any incomplete grid bars can lead to failure of the algorithm. In fact, when hole filling is processed, if the grid is not perfectly bounded this algorithm fails.

In the present work, we have developed a different approach, essentially based on the fact that a Malassez grid is a regular and doubly periodic shape. We therefore chose the Fourier transform to identify the periods in the image (Cooley, 1965), and the Hough transform (Shapiro, 2001) to identify and reconstruct the grid precisely as a set of straight lines. We then benchmarked this algorithm in order to prove its robustness to perturbations such as noise or defocus and evaluated the quality of detected grids over a set of 137 images. As an application, we counted cells within the detected grid using a method based on threshold and form.

Received July 8, 2014; accepted November 5, 2014

*Corresponding author. Ambroise.marin@agrosupdijon.fr

The result of our work is a very robust algorithm, which is able to recognize and remove the grid from the image without removing the cells intersecting the grid. The method also extracts a ROI based on external lines of the detected grid.

MATERIALS AND METHODS

Biological Materials

Strain and Growth Conditions: The yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171 was used in this study. Yeast cells were maintained in Petri dishes in a modified Malt Wickerham medium supplemented with 20 g/L agar (VWR International, Limonest, France). The modified Malt Wickerham medium was composed of 10 g of glucose (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), 3 g of pancreatic peptone (VWR International), 3 g of yeast extract (Sigma), and 1.5 g of NaH_2PO_4 (VWR International) in 1 L of a water and glycerol solution, which had an osmotic pressure of 1.38 MPa (5.1 g of glycerol/100 g of distilled water; Sigma); the pH was adjusted to 5.35 by the addition of orthophosphoric acid (Sigma). A single yeast colony was introduced into a 250 mL conical flask containing 50 mL of modified Malt Wickerham medium and shaken (250 rpm) for 48 h at 25°C. Then, 100 μL of this culture was poured into two 250 mL conical flasks (control and stress) containing 50 mL of modified Malt Wickerham medium which had an osmotic pressure of 1.38 MPa. Flasks were shaken (250 rpm) for 24 h at 25°C. Every 24 h yeast cells were harvested, collected by centrifugation (2,880 \times g, 25°C, 5 min) and poured into a 250 mL conical flask containing 50 mL of modified Malt Wickerham medium which had an osmotic pressure of either 1.38 MPa (control) or 3 MPa or more (stress).

Osmotic pressure adjustment and measurement of the growth medium: osmotic pressure of the Malt Wickerham medium was adjusted by solubilizing growth medium powders (see Strain and Growth Conditions section) in a binary water/glycerol solution which had a determined osmotic pressure. To obtain binary solutions with different osmotic pressures, the mass of solute (i.e., glycerol) to be added to 1,000 g of distilled water was determined using the Norrish equation (Norrish, 1966). Osmotic pressure was verified with a dew point osmometer (Decagon Devices Inc., Decagon Devices Europe, Dardilly, France).

Acquisition System (Microscope) and Acquisition Methods

Culture of 100 μL (at different levels of osmotic pressure) were sandwiched between a Malassez blade and a coverslip. Samples were observed under the microscope 3 min after preparation in order to allow yeasts to sediment.

Yeast cells were visualized by using an upright microscope (Axioplan 2imaging, Zeiss, Marly le Roi, France) equipped with a black and white camera (AxioCam MR, Zeiss) driven by the AxioVision Rel 4.8.0.0 software (Zeiss).

A $\times 63$ objective was used to observe cells. A total of 137 images were taken in the context of the present work.

Images and Properties

All images in the database have the same dimensions, 1296×1026 pixels, but show a slight variability in spatial resolution. This means that the Malassez grid does not have the exact same scale in resulting images.

Depending on the operator and kind of sample observed, there is a large variability in image illumination (Figs. 1a, 1b) and contrast (Figs. 1b, 1c).

In the course of our experimentation, orientation issues occurred when blades were not correctly positioned under the microscope. This situation resulted from the absence of any locking system of the blade in the microscope (Fig. 1d).

Depending on the kind of solute used, defocusing and reduction in the depth of the field may become recurrent problems (Fig. 1e).

Other disturbances (electric noise, solute contamination, high cell density, etc.) can lead to misrecognition of the grid (Figs. 1f–1h).

Grid Detection

In Malassez images, four distinct kinds of objects are identified: background, grid, cells and in certain cases, artifacts. As a principal object, the grid has a heavy semantic value. In Malassez images, the grid appears as a doubly periodic object; Therefore, using a Fourier transform seems an efficient way to extract it.

First, a two dimensional fast Fourier transform (FFT) was performed on a target image using equation (1) where (k_x, k_y) are the coordinates in the transformed image, N_x and N_y represent the size of the original image and (n_x, n_y) are the coordinates in the image

$$\text{FFT}(k_x, k_y) = \frac{1}{\sqrt{N_x N_y}} \sum_{n_x=0}^{N_x-1} \sum_{n_y=0}^{N_y-1} f(n_x, n_y) e^{-j2\pi \frac{k_x n_x}{N_x}} e^{-j2\pi \frac{k_y n_y}{N_y}} \quad (1)$$

It is supposed that a periodic object in an image produces an easily identifiable signature in the Fourier projection. In the centered module projection of the FFT, a high energy cross pattern is observed. Observations show that this pattern is centered and its orientation is highly correlated with grid orientation in the image. Therefore, the hypothesis is that this cross pattern is the spectral signature of the grid. This hypothesis was further validated after extraction of this signature.

The second step is the extraction of the grid signature in the FFT projection (Fig. 1b). We wanted to extract the two groups of aligned points which form the cross pattern in the FFT module space. To do this, a threshold was defined empirically at 65% of the maximum of the logarithm of the FFT modules.

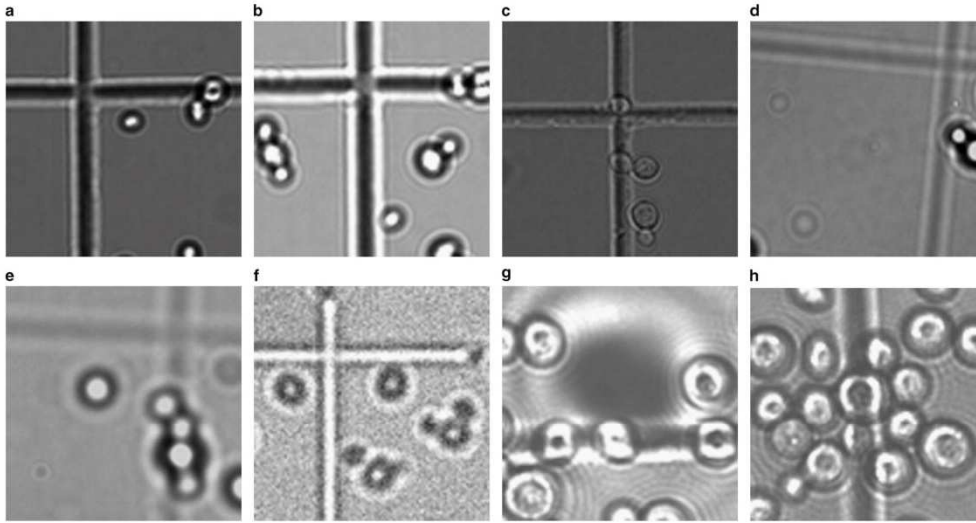


Figure 1. Samples of images showing variability.

To accurately determine the parameters of the two lines forming the cross pattern, the classical Hough line detection method (Shapiro, 2001) appeared to be a solution.

The Hough transform returns a (ρ, θ) parametric space, as shown by equation (2), where x, y are the coordinates in the image and θ varies between -90 and 90° .

$$\rho = x \cos \theta + y \sin \theta. \quad (2)$$

In this space, a specific pixel in the original image produces a sinusoidal curve. This sinusoidal curve represents lines in the original image space that go through this pixel for a set of angles θ ; usually θ varies from -90 to 90° with a 1° step. The intersection of two sinusoids represents the line (ρ_1, θ_1) going through two pixels. Therefore, larger clusters of intersections represent larger collinear groups of pixels.

The ρ and θ parameters of the two lines forming the cross pattern are determined by the two largest clusters in the Hough parametric space (Fig. 2c).

The next step was the extraction of the grid spectral signature from the FFT. Using the two sets of parameters previously determined and the Bresenham algorithm (Bresenham, 1965), a set of frequencies was extracted from the FFT matrix.

In a two dimensional discrete space, the Bresenham algorithm aims at determining points that approximate a line as shown in equation (3)

$$\dot{y} = \left[\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} (\dot{x} - x_1) + y_1 + 0.5 \right].$$

$$\dot{x} = \{x \in \mathbb{N} \mid x \geq x_1, x \leq x_2\} \quad (3) \text{Bresenham algorithm}$$

In this application (\dot{x}, \dot{y}) , are the discrete coordinates of the FFT matrix cells along the segment going through (x_1, y_1)

and (x_2, y_2) which are the intersections between the lines previously computed with the Hough transform and the FFT matrix boundaries.

An inverse FFT was performed on extracted frequencies. This resulted in an image representing the grid information. This step thus validates the previously formulated hypothesis concerning the meaning of the observed cross pattern.

Precise Fitting of the Grid with Parametric Lines

It was now necessary to find a parametric grid that fits the grid information. The Hough transform is also used for parametric grid retrieval. In its most classic use, the Hough transform is carried out after an edge filtering with, for example, Canny (Shapiro, 2001) or Sobel (Gupta, 2013) operators (Figs. 2a, 2b).

The resulting lines (Fig. 2c) are not centered on a grid bar but rather fit with edges that the operators have found; therefore, the parametric grid does not fit optimally. In addition, spaces between parallel lines of the resultant grid vary; hence, the resulting grid is not regular. Consequently, this result is not usable for further treatments such as statistical analysis or cell concentration measure.

Our next step was to substitute morphological operations for edge detection in the image before using the Hough transform. First, a top hat operator (Serra, 1982) was applied with a disc shaped structural element in order to clear the background. Second, the image was binarized using a 20% threshold, then an opening (Serra, 1982) followed by a dilatation (Serra, 1982) was applied to uniform grid bars. Finally, a skeleton (Serra, 1982) operation was performed to extract

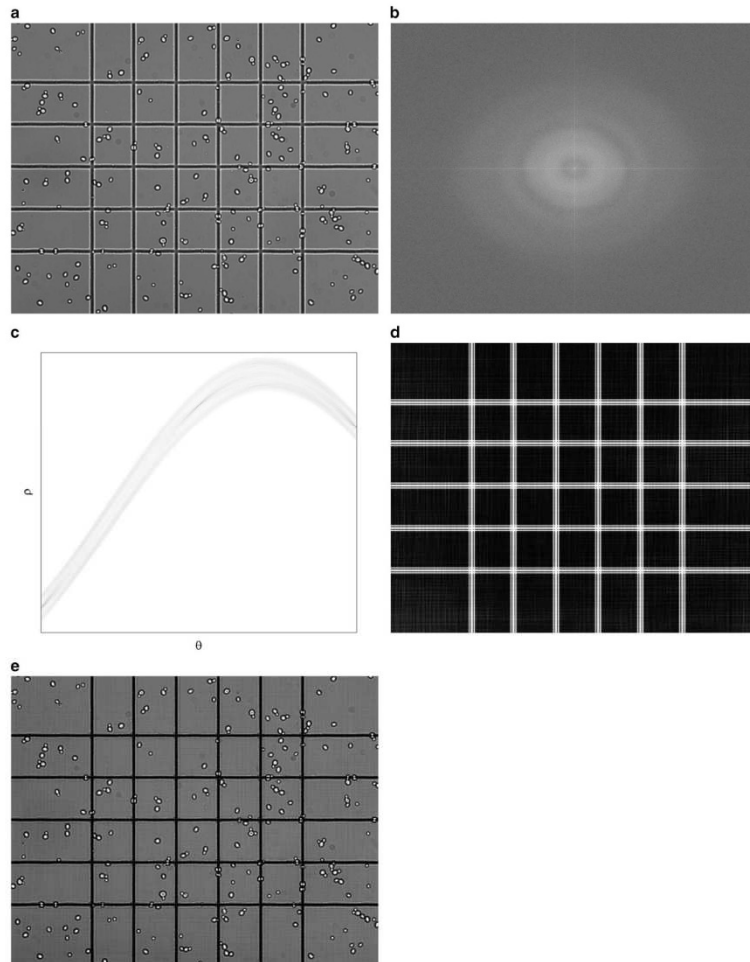


Figure 2. Original image (a), FFT (b), Hough Transform (c), grid information (d), filtered image (e).

pixels from the medium axis of the bars (Fig. 3a). Note that minor artifacts occasionally remain after clearing of the background and can result in non-significant local aberrations within the skeleton. See Figure 3a: the left bar shows an “inverted C” shaped aberration.

Based on this grid skeleton, the Hough transform was performed (Fig. 3b). Resulting lines are centered and the resulting grid is regular (Fig. 3c).

ROI and Cell Segmentation

Based on the previously computed parametric grid, a rectangular area is defined by outer lines. This is the ROI of a

Malassez blade. Cells are counted only within this ROI. The real size of this ROI is known and allows an estimation of the scale of the image.

For cell detection, the grid information previously extracted with the FFT method was subtracted from the original image. In the resulting image, the grid is attenuated and allows the extraction of cells using the Otsu threshold method (Otsu, 1979).

A cleaning step, consisting of an opening morphological operation which aims at removing isolated outlier pixels, was applied.

A shape analysis was then performed. This first consists of a measure of solidity, which is the proportion of pixels that

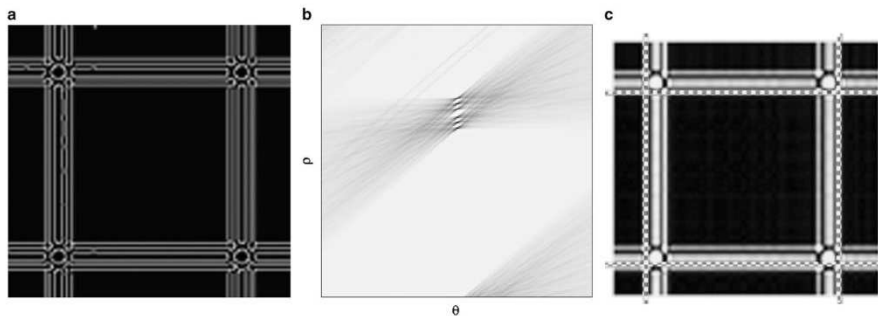


Figure 3. Canny filter (a), Hough transform (b), resultant grid lines (c).

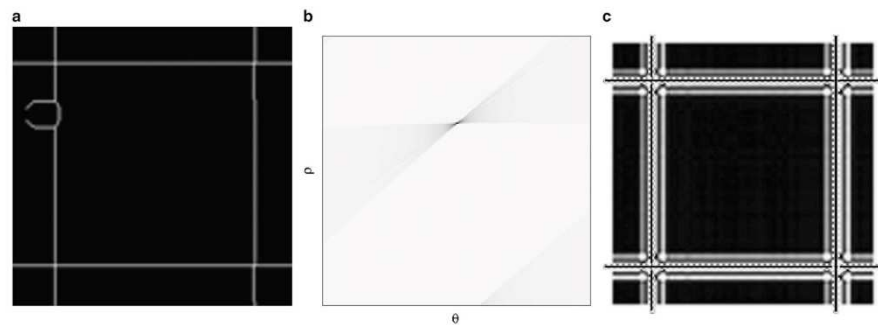


Figure 4. Grid skeleton (a), Hough transform (b), resultant grid lines (c).

belong to the area and its convex hull. In most cases, a cell should be a convex object; hence, if the solidity of the area is $<75\%$, it is eliminated.

Second, a ratio between the minor and major axes of the area is calculated. In the context of the present study, it is assumed that a cell is a roughly circular object, so this ratio should be as close as possible to 1. In fact, cells or cell groups are frequently elongated; experimentally, a limit of 0.66 was chosen for this criterion.

Third, as the size of the cells is known, the estimated scale allows for elimination of objects which are too small. For bigger objects, it is assumed that they may be groups of cells and thus shape factor parameters become more flexible; in fact, they are divided by a factor of 2.

RESULTS

Reference Image Generation

In order to proceed with robustness tests with controlled images, a reference grid was designed. An image characterized by low noise and low cell density, in which the grid was very clear, was selected. The grid orientation was also taken into account, in order to allow for easy averaging. First, a part

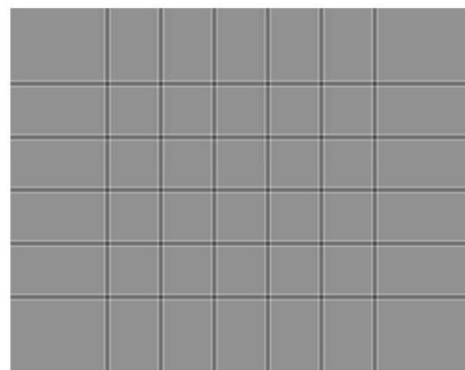


Figure 5. Synthetic grid.

of the grid was sampled. A reference grid profile was obtained by averaging this sample along its axis. Then, this profile was used to generate an empty grid (Fig. 5).

Disturbances, such as noise or contrast variation, were further added to this model in order to generate a set of disturbed images.

Table 1. Correlation of C_v With Actual Grid's Bars Positioning Error.

E_c	E_l	$\sqrt{E_c^2 + E_l^2}$	C_v
0	0	0	0
0	1	1.00	0.45
1	0	1.00	0.51
1	1	1.41	0.68
0	2	2.00	0.91
2	0	2.00	1.01
2	2	2.83	1.36
0	5	5.00	2.27
5	0	5.00	2.54
5	5	7.07	3.40
0	10	10.00	4.54
10	0	10.00	5.07
10	10	14.14	6.81
0	15	15.00	6.81
15	0	15.00	7.61
15	15	21.21	10.22

This model was used as a benchmark.

To evaluate grid detection quality, two parameters were then considered. First, the grid ratio between height and width is known; for each retrieved grid, this ratio was computed and expected to be as close as possible to 4/5, which is the real grid ratio. Second, the regularity of the grid was assessed using the relative standard deviation (RSD) of the 20 sub-square areas. This coefficient C_v was determined by equation (4), where μ is the mean and σ the standard deviation:

$$C_v = 100 \frac{\sigma}{\mu}. \tag{4}$$

To facilitate the interpretation of C_v , errors were added in a synthetic grid in order to find a correlation between C_v and a global error in the bar positions of the grid, expressed in pixels. E_c represents the pixel shifting of one central column bar. E_l represents the pixel shift for a central line bar. Global error is expressed by calculating the modulus of the vector (E_c, E_l); see Table 1.

Robustness of the Grid Extraction Method in terms of Scale, Luminosity, Contrast, Orientation, Defocusing and Noise Issues

In order to measure robustness to the scale factor (SF), a synthetic grid was scaled with factors SF 101, 102, 104, 108, 116, and 132% (Table 2).

In order to examine luminosity issues, a set of over and under-exposed synthetic grids was generated using a set of luminosity factors (LF) (1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4), (Table 3).

To test orientation robustness, rotations of 1, 2, 4, 8, 16, and 32° were applied to the synthetic grid (Table 4).

Defocusing was simulated by adding a zero mean Gaussian blur to the synthetic grid. Simulated defocusing

Table 2. Robustness to Scaling Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

SF (%)	C_v	ROI Ratio
100	0	0.800
101	0.5	0.800
102	0	0.800
104	0	0.800
108	0	0.800
116	0	0.800
132	0	0.800

SF, scale factors; ROI, region of interest.

Table 3. Robustness to Luminosity Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

LF	C_v	ROI Ratio
1/32	0	0.800
1/16	0	0.800
1/8	0	0.800
1/4	0	0.800
1/2	0	0.800
1	0	0.800
2	0	0.800
4	0	0.800

LF, luminosity factors; ROI, region of interest.

Table 4. Robustness to Rotation Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

Angle	C_v	ROI Ratio
1	0.39	0.800
2	0.5	0.800
4	0.28	0.800
8	0.91	0.800
16	0.33	0.800
32	0.46	0.799

ROI, region of interest.

Table 5. Robustness to Defocusing Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

Blur Standard	C_v	ROI Ratio
1	0	0.800
2	0	0.800
4	0	0.800
8	0	0.800
16	0.12	0.800

ROI, region of interest.

increases with blur standard deviation, whose chosen values were 1, 2, 4, 8, and 16 (Table 5).

A factor C was used in order to adjust the contrast. Input values between zero and one were mapped between C and 1-C. Note that |C| should not exceed 0.5, which results in a uniform gray image (zero contrast) (Table 6).

Table 6. Robustness to Contrast Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

C	C_v	ROI Ratio
-0.35	0	0.800
-0.25	0	0.800
-0.15	0	0.800
-0.05	0	0.800
0	0	0.800
0.05	0	0.800
0.15	0	0.800
0.25	0	0.800
0.35	0	0.800

ROI, region of interest.

Table 7. Robustness to Noise Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

Noise Standard	C_v	ROI Ratio
0	0	0.800
0.01	0	0.800
0.02	0	0.800
0.04	0	0.800
0.08	0	0.800
0.16	0.45	0.800
0.32	0	0.800
0.64	0.32	0.798
1.28	1.94	0.796
2.56	2.29	0.793

ROI, region of interest.

Finally, for evaluation of noise robustness, a zero mean Gaussian noise was added to a synthetic grid with the following standard deviations: 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, and 2.56 (Table 7).

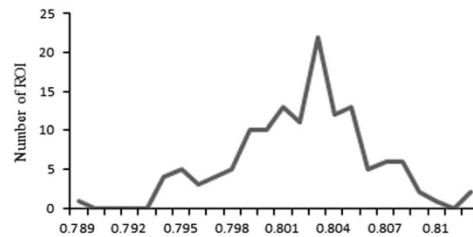
Results of ROI and Grid Extraction

Two of the 137 images were eliminated because the grid was not entirely visible, so the results were not relevant.

For the 135 images in which the grid was complete, a ROI was detected in every case. The RSD of the ROI ratio never exceeded 1.54% and was <0.7% in 107 out of the 135 images. The average RSD was 0.45%. In fact, 0.7% represents a one pixel error on grid bar positioning; as a perfect positioning of the ROI may not match with the pixel matrix, a ROI of <0.7% error is considered to be very well positioned. An error of 1.4% signifies a two pixel error.

When the distribution of the ROI ratio over the sample of 135 images was traced, we observed that statistically the target ROI ratio was 0.803 (see Fig. 6). This shifting can be explained by standard tolerances in the Malassez grid building process.

Figure 7 presents an example of an image with its detected ROI.

**Figure 6.** Distribution of region of interest (ROI) ratio.

For the 135 selected images in our sample, the RSD of 40 grids was <1%; 94 grids were below 2% and 132 grids were below 5%. In the three remaining images, the C_v was over 12%. This indicates that the algorithm failed to find at least one bar of the grid for these images (Figs. 8, 9).

Figure 10 presents an example of an image with its detected grid.

Results of Cell Segmentation and Cell Counting

An Otsu threshold was applied and following this, a standard set of parameters was determined for cell segmentation: minimum and maximum target cell sizes were set at 3 and $25 \mu\text{m}^2$, respectively. The solidity parameter was set at 75% for clusters in target sizes and at 37.5% for bigger clusters. The ratio parameter was set at 2/3 for clusters in the target size and 1/3 for bigger ones. Five images with noise, focus, contrast, illuminant and grid orientation issues were selected as examples of resulting cell segmentation with standard parameters (Figs. 11–15). Table 8 sums up the manual and automatic cell counts for these five images with the percentages of difference between them (Δ).

DISCUSSION

Robustness tests show that our method for grid extraction is not affected by scale, light, contrast, or focus issues. These tests show that a very strong noise can induce a RSD of grid bar positioning of up to 2%, which represents ~5 pixels of cumulated error in positioning for the grid bars. As real cases never present such a noise level, we may thus consider that the method is not sensitive to noise issues. The rotation test induced a RSD of up to 0.9%, which represents ~2 pixels of cumulated error in positioning for the grid bars. In fact, as this induced error is not correlated with angle value, we assume that it is due to the discretization of the grid and thus consider that the method is not affected by rotation issues.

In images that present a highly contrasted grid, subtracting grid information allows for the separation of cells with a threshold method. It was observed that, in cases of low contrast grids, extracted information intensity is low; hence, its removal from the original image does not really impact threshold quality. In this case, cell segmentation relies mainly on morphological and form factor methods.

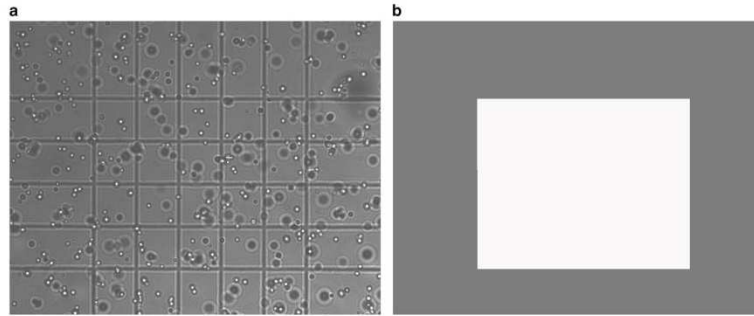


Figure 7. Initial blade image (a) and detected region of interest (ROI) (b).

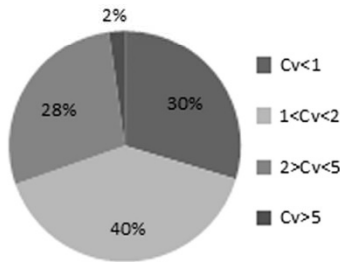


Figure 8. Relative standard deviation for 135 images sample.

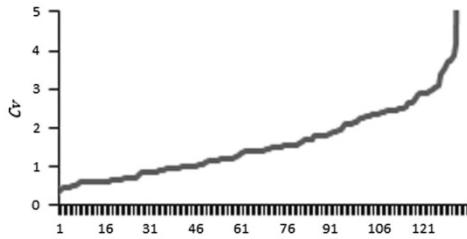


Figure 9. C_v values for 135 images sample, images sorted by increasing C_v .

A standard set of parameters was empirically determined for morphological and form factor phases. The results are acceptable, but can be optimized by fine-tuning parameters depending on input image quality and expected cell sizes.

CONCLUSIONS

Here we propose a robust method for grid extraction based on Fourier and Hough transforms. We applied this method to a set of 137 Malassez images. In our 137-picture sample, which shows extreme variability, our method was able to detect a correct ROI for all images, except for two in which the grid was not complete. For the 135 images in which a ROI was detected, our method produced a complete grid with a good RSD in almost all cases. Nevertheless, in three images, our method failed to find at least one bar of the grid ($RSD > 10$), however it found a good ROI as exterior lines were correctly detected.

We then used raw grid information in order to facilitate cell segmentation using the Otsu threshold method and demonstrated the possibility of obtaining good quality cell segmentation in almost all images in our set. This, however, depends on individual fine tuning of post threshold shape analysis. Nevertheless, the threshold method for cell

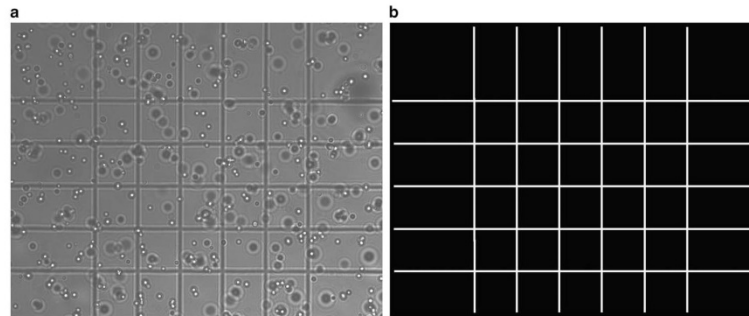


Figure 10. Initial image (a) and detected grid (b) with $C_v = 0.9$.

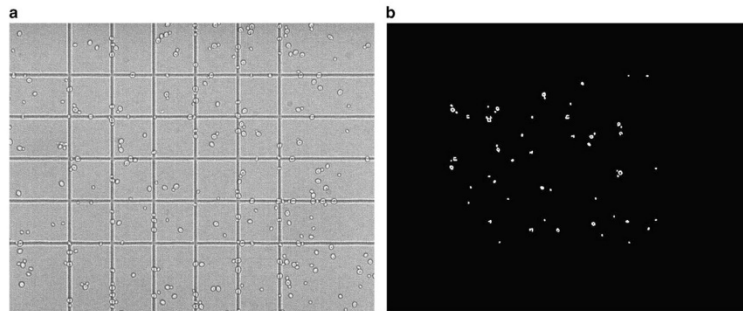


Figure 11. Noisy and low contrast image (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

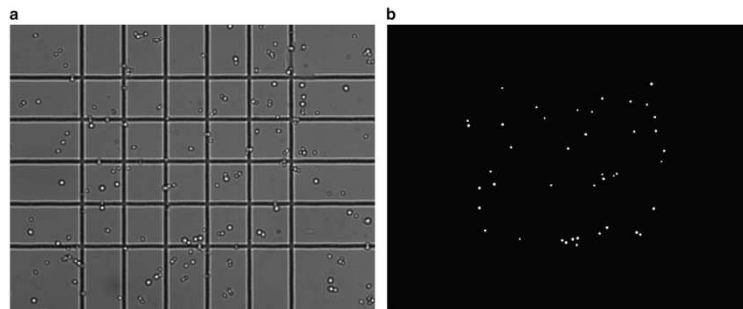


Figure 12. High contrast image (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

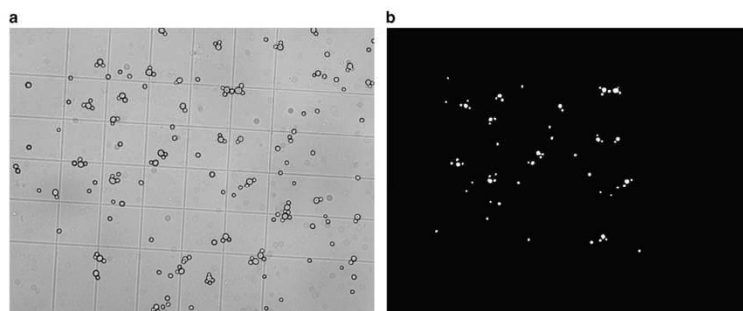


Figure 13. Image with rotation issue, measured about 3° clockwise (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

extraction presents certain drawbacks, for example it is highly noise sensitive and it does not work well with dark objects. Otsu-based segmentation results are core or ring shaped cells, which can cause problems in terms of counting by inducing double detection. Cell segmentation using the Otsu threshold also performs poorly with aggregated cells, which are considered as a single object, inducing a logical failure at the shape analysis stage. In fact, this problem can be

solved by using watershed methods. We further plan to concentrate on improving grid extraction quality, especially in case of rotation, by trying to suppress artifacts generated after Fourier transform filtering.

In the research reported here, we focused on grid extraction, not on cell segmentation and counting. We now plan to improve cell segmentation quality by substituting circular Hough transform or frequency-based methods for

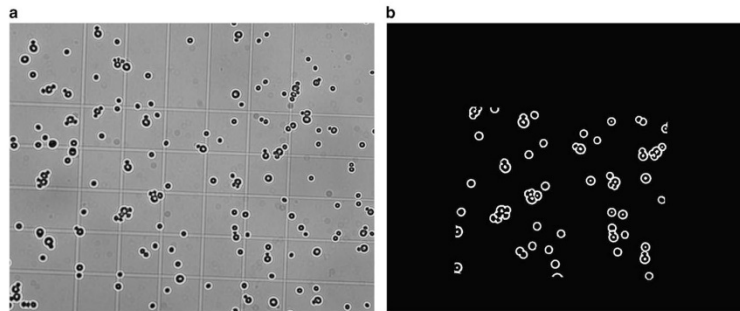


Figure 14. Image with luminosity issue and “black” cells (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

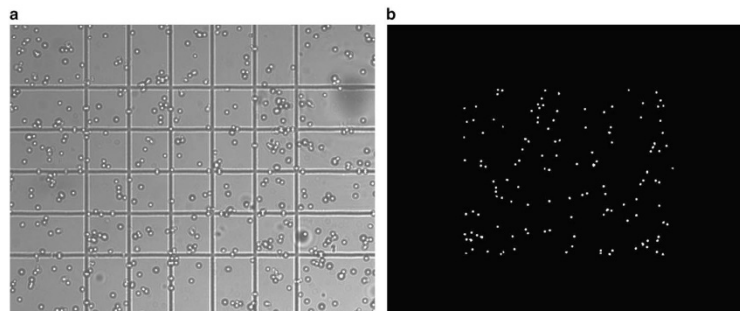


Figure 15. Defocused image (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

Table 8. Relative Errors Between Manual and Automatic Counts.

	Manual Count	Automatic Count	Δ (%)
Image 1	54	60	10
Image 2	42	52	19.2
Image 3	61	63	3.2
Image 4	62	58	6.9
Image 5	131	141	7.1

the Otsu threshold method, and cell counting by using watershed methods or an intelligent combination of these three methods.

Finally, our ultimate aim is to provide a fully automatic image analysis tool for cell extraction and counting in generic hemocytometer microscopy images.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Jean-Marie Perrier Cornet and Laurence Dumas for promoting the development of this work, and to the DSI/CCUB staff of the Burgundy university for the help on Matlab® software use.

REFERENCES

- BRESENHAM, J.E. (1965). Algorithm for computer control of a digital plotter. *IBM Syst J* **4**(1), 25–30.
- CHEN, Y.W. & CHIANG, P.-J. (2011). Automatic cell counting for hemocytometers through image processing. *World Acad Sci Eng Technol* **5**.
- COOLEY, J.W. & TUKEY, J.W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex fourier series. *Math Computation* **19**, 297–301.
- GUPTA, S. & MAZUMDAR, S.G. (2013). Sobel edge detection algorithm. *Int J Comp Sci Manag Res* **2**(2), 1578–1583.
- HIBAR, K., DAAMI-REMADI, M., AYED, F. & EL MAHJOUR, M. (2007). Fusarium crown and root rot of tomato and its chemical control. *Int J Agric Res* **2**.
- NORRISH, R.S. (1966). An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *J Food Technol* **1**, 25–39.
- OTSU, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica* **11**, 23–27.
- SERRA, J. (1982). *Image analysis and mathematical morphology*, v. 1, Academic press.
- SHAPIRO, L., STOCKMAN, G.C. (2001). *Computer Vision*. 2001. ed: Prentice Hall.

b. Reliable detection and smart deletion of Malassez counting chamber grid in microscopic white light images for microbiological applications

Cet article peut être vu comme un complément de l'article précédent. Nous présentons ici un ensemble d'améliorations apportées au processus de caractérisation de la grille et qui permettent d'obtenir une bien meilleure précision dans la caractérisation de la grille de Malassez.

Un peu plus en détail, nous présentons l'ensemble des améliorations faites en amont du calcul de la FFT et les ajustements faits lors des traitements dans l'espace fréquentiel afin d'améliorer la caractérisation de la grille de comptage.

Nous présentons également l'étude sur le ratio de la zone d'intérêt obtenu et le résultat obtenu sur la significativité du décalage constaté qui nous permettant d'identifier la marque des lames de comptages utilisées.

Nous présentons également la méthode permettant son effacement réel dans l'image, résultat qui n'était pas encore tout à fait aboutit car, concernant l'effacement de la grille, nous opérons uniquement dans l'espace image lors de la première publication, ce qui donnait un résultat discutable.

Reliable Detection and Smart Deletion of Malassez Counting Chamber Grid in Microscopic White Light Images for Microbiological Applications

Emmanuel Denimal,^{1,2,*} Ambroise Marin,^{1,2} Stéphane Guyot,³ Ludovic Journaux,^{2,4} and Paul Molin^{2,3}

¹Service Systèmes d'Information, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

²Groupe Modélisation Numérique en Agronomie et AgroAlimentaire, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

³UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

⁴Laboratoire Electronique, Informatique et Image, Université de Bourgogne, UFR Sciences et Techniques allée Alain Savary, 21000 Dijon, France

Abstract: In biology, hemocytometers such as Malassez slides are widely used and are effective tools for counting cells manually. In a previous work, a robust algorithm was developed for grid extraction in Malassez slide images. This algorithm was evaluated on a set of 135 images and grids were accurately detected in most cases, but there remained failures for the most difficult images. In this work, we present an optimization of this algorithm that allows for 100% grid detection and a 25% improvement in grid positioning accuracy. These improvements make the algorithm fully reliable for grid detection. This optimization also allows complete erasing of the grid without altering the cells, which eases their segmentation.

Key words: Malassez, Fourier transform, noise filtering, homomorphic filtering, image analysis

INTRODUCTION

Recent progress has made automation of cell counting possible. However, it must be pointed out that from 2010 to 2014 >400 papers described the use of Malassez counting chambers (or hemocytometers) to estimate cell concentration. Different fields of biology were concerned, including microbiology (Philippe et al., 2014), hematology (Bargougui et al., 2013), cancer biology (Valque et al., 2012), and marine biology (Mai et al., 2013). Such an observation suggests that we still need semi-automated cell counting using a Malassez (or Thoma) chamber. The word “semi” is justified by the need to take some photos of biological cells spread on a Malassez chamber placed under a microscope. The word “automation” relates to the use of an algorithm and software to routinely analyze cells and measure the concentration, size, shape, and homogeneity of cell distribution. In a recent work, we presented a method for grid detection in Malassez slide images under white light microscopy (Marin et al., 2014). This method successfully found the region of interest (ROI) bounded by the external bars of the grid in 97.8% of the 135 images, but failed at finding at least one bar of the grid for the remaining images. In that previous work, we showed the robustness of this method. Nevertheless, homogeneity of background luminosity and noise issues can affect the precision of grid bar positioning. Hence, we added a homomorphic filter (Williams &

Madisetti, 1997) and a noise filter step (Kovesi, 1999). We later found that low contrast can induce problems in cross-pattern detection in frequency space which appeared as the main explanation for the method failure in 2.2% of the images. Therefore, we worked on improving grid detection by acting on image contrast and on enhancement of cross-pattern detection in frequency space. We present here this improved grid detection method. We also present an improved grid deletion method that allows better segmentation of cells for further processing. By suppressing all cases of failure, these improvements make our method fully reliable.

MATERIALS AND METHODS

First, we calculate the peak signal-to-noise ratio of the image and if it exceeds a threshold set empirically, we treat the noise using a filter developed by Kovesi (1999). Figure 1 shows an example of a filtered picture by this algorithm. This filter relies on nonorthogonal, complex valued, log-Gabor wavelets, and preserves phase. Second, as a brightness gradient can be observed in some images, image luminosity is normalized by applying a homomorphic filter (Voicu et al., 1997; Williams & Madisetti, 1997). The principle of homomorphic filtering is to remove high frequency (considered as reflectance) and keep low-frequency (considered as luminance). The background is thus suppressed by low-pass filtering of the image logarithm and by taking the exponential to restore the image (Williams & Madisetti, 1997) (Fig. 2).

Received March 18, 2015; accepted April 29, 2015

*Corresponding author. emmanuel.denimal@agrosupdijon.fr

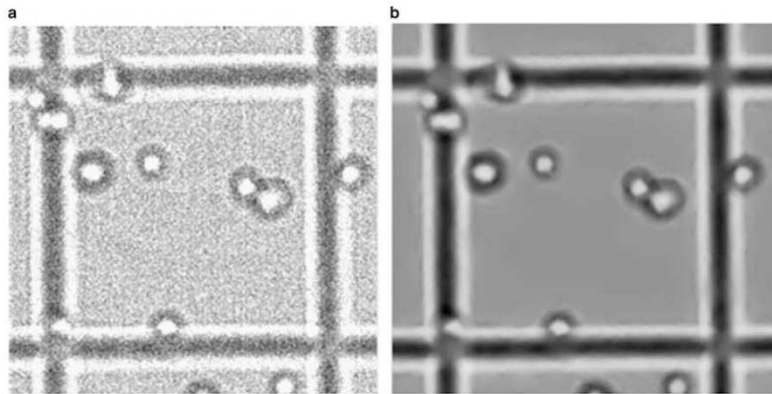


Figure 1. a: Original picture, (b) filtered picture.

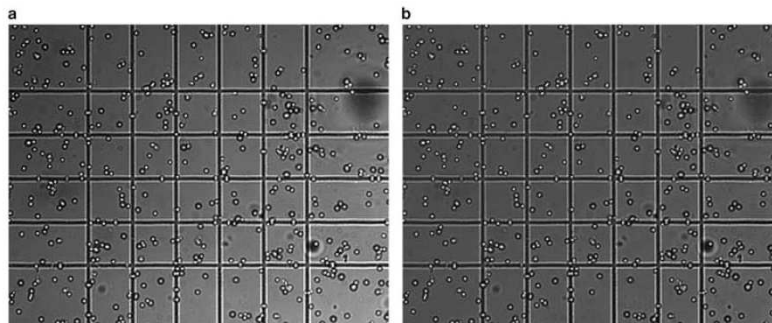


Figure 2. a: Original picture, (b) picture after application of homomorphic filter.

IMPROVED DETECTION

We investigated the failures and realized that in the case of rotation problems, applying the two-dimensional fast Fourier transform (2D FFT) algorithm directly on the image generates a cross-pattern artefact due to sharp discontinuities at the boundaries of the four image blocks (Williams & Madisetti, 1997) (Fig. 3). This artefact can be confounded in frequency space with the cross pattern we are looking for; hence, it explains failures. In order to deal with this problem, images are windowed and smoothly faded to zero using a centered sinusoidal mask. The grid information is located in the center of the image so that the process does not affect it.

When the grid contrast is low, the cross pattern we are looking for in the FFT can be masked by other frequency information. A second 2D FFT is computed, based on an image with enhanced contrast. As shown in Figure 4, the cross pattern appears more clearly, which allows for improved detection.

IMPROVED DELETION

In our previous work (Marin et al., 2014) we extracted the absolute value of the grid signal and we subtracted it from the original image in order to facilitate segmentation methods based on thresholds. This subtraction has two major drawbacks: first, there remains a strong black imprint of the grid. With some types of dark cells, this causes problems for the subsequent segmentation method based on a threshold. Second, the cells that intercept the grid are degraded by this operation. In most cases cells are divided into two parts, which may lead to false positives in detection of the cells. One of the main proposed improvements is deletion of the grid in the original image without altering cells that intercept bars. This deletion is performed by splitting the grid signal into a positive and a negative part, which represent bright and dark parts, respectively, of the grid (Fig. 5). Then the bright part of the grid signal is subtracted and the dark part of the grid signal is added to the image. It results in an image with intact cells and a grid that has been erased.

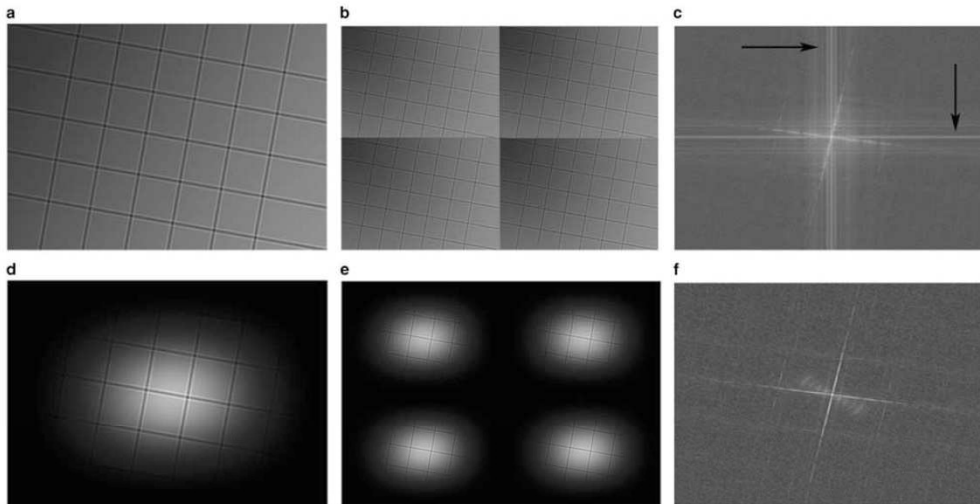


Figure 3. **a:** Original image, **(b)** four images blocks generated by 2D FFT algorithm, **(c)** 2D FFT frequency space, arrows show artefacts created by discontinuities, **(d)** windowed image, **(e)** windowed image blocks, **(f)** 2D FFT frequency space after windowing. 2D FFT, two-dimensional fast Fourier transform.

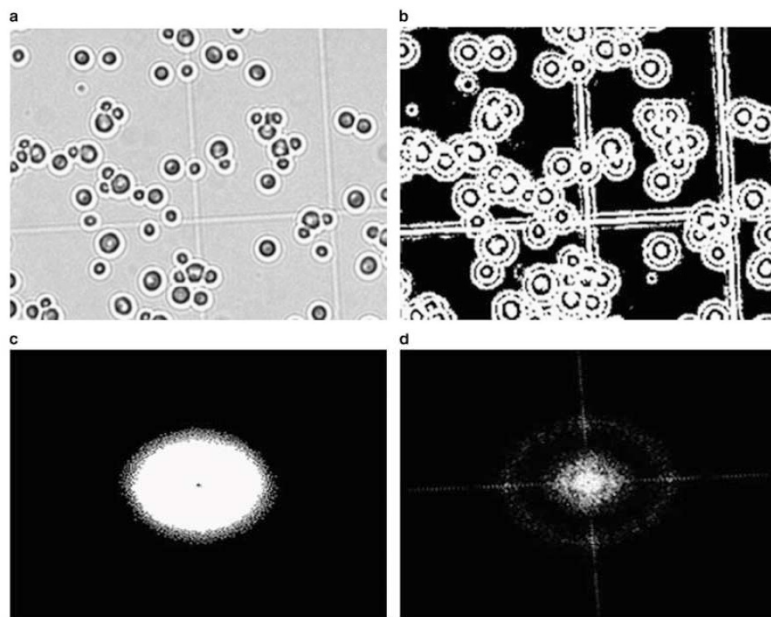


Figure 4. **a:** Original image with low contrast **(b)** image with enhanced contrast **(c)** 2D FFT of original image **(d)** 2D FFT of enhanced contrast image. 2D FFT, two-dimensional fast Fourier transform.

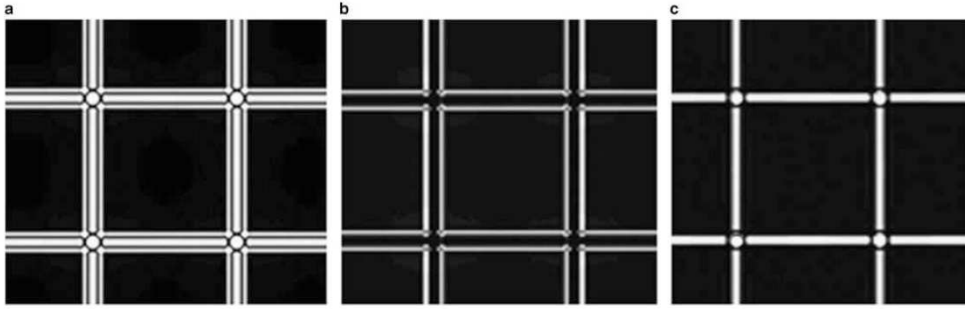


Figure 5. a: Original filter (b) positive part (c) negative part.

RESULTS

Grid Characterization Improvements

Grid positioning accuracy is evaluated by using the relative standard deviation (C_v) of the 20 sub-square areas. C_v is determined by equation (1), where μ is the mean and σ the standard deviation of sub-square area:

$$C_v = 100 \frac{\sigma}{\mu}. \quad (1)$$

From previous work, it is observed that grids whose C_v value is below 1% are accurately positioned. Grids whose C_v value is between 1 and 2% are very well positioned. Grids whose C_v value is between 2 and 5% can show slight inaccuracies in bar positioning. Grids whose C_v exceed 5% are considered inaccurate. In some cases, a C_v over 5% can indicate serious error in grid positioning or, in worse cases, a failure of the algorithm.

For the 135 selected images of the sample, the relative standard deviation of 41 grids is <1%, 67 grids is between 1 and 2% and 25 grids is between 2 and 5%. For the two remaining images, C_v is 6.2 and 21%, respectively.

The optimized algorithm is better on average, but in some cases the original algorithm remains the better of the two. We get the best grid placement accuracy by combining the two methods, and by keeping the results with the lowest C_v .

Figure 6 presents the sorted C_v values for the 135 images, computed first with the original algorithm, second with the optimized algorithm, and third with the combined best results.

With original and optimized algorithms, the amount of precisely positioned grids is 30%, it rises to 46% with the combined method. The amount of well-positioned grids increases from 40 to 50% with the optimized algorithm and is 44% with the combined method. For the calculation of improved C_v , only 132 of the 135 images are considered because the previous algorithm failed in three cases and C_v is not significant. The average C_v is 1.6% with the original algorithm, 1.4% with the optimized algorithm, and decreases to 1.18% with the combined method, which represents a

25.5% improvement in the quality of grid positioning (Table 1).

The number of grids with a $C_v > 5\%$ improved from three grids when using the original algorithm to two grids when using the optimized algorithm. For these two grids, the optimized algorithm does not fail; it returns grids whose C_v is 6.2 and 21%, respectively (71 and 122% with the original algorithm).

Grid Deletion

Figure 7 shows an example of grid deletion in an image. This deletion process may leave some artefacts (crosses) in the neighborhood of each cell. These artefacts come from the deletion process. It deletes complete lines in the frequency space instead of deleting the exact signature of the grid, which is actually only a part of these lines. An improvement could be done by adequate modeling of this signature; nevertheless, further segmentation processes are not affected by these minor artefacts. Figure 8 shows the gray levels along a bar profile in the original image and in the corrected image. With the optimized algorithm, the profile of gray levels along a bar of the grid is flattened and the background gray levels are lowered.

DISCUSSION

In our previous work, with the same set of images, our algorithm failed for three of them. These failures were the loss of at least one bar of the grid and/or the detection of a false bar. With the optimized algorithm, there is no failure. In the worst case ($C_v = 21$), all bars are detected but they are inaccurately positioned. Note that this image is very specific, it is possible to find adapted settings in order to have a good result, but those particular settings do not work properly for others. We selected a set of settings that leads to 100% success in grid detection because the ultimate goal of this work is to provide an entirely automatic reliable algorithm.

With the original algorithm, 70% of the grids are very well positioned ($C_v < 2$). With the optimized algorithm, 80% of the grids are very well positioned. We observed that for

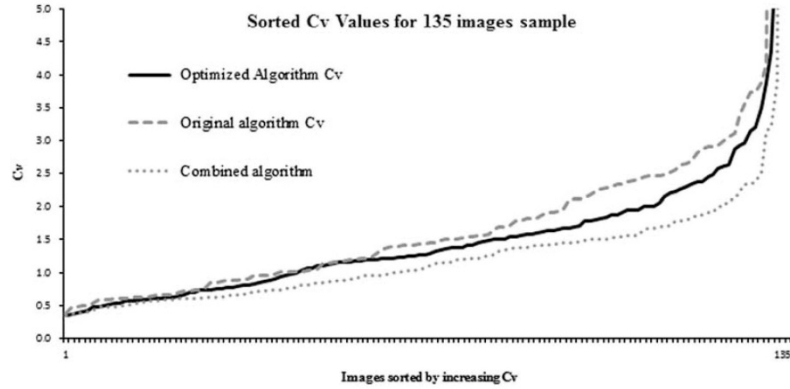


Figure 6. Sorted C_v values.

Table 1. Proportion of Image With Accurate, Very Good, Acceptable, and Poor Grid Positioning Depending on the Algorithm.

	Original (%)	Optimized (%)	Combined (%)
$C_v < 1$ —accurate grid positioning	30	30	46
$1 < C_v < 2$ —very good grid positioning	40	50	44
$2 > C_v < 5$ —acceptable grid positioning	28	19	9
$C_v > 5$ —poor grid positioning	2	1	1

some images with low C_v , the original algorithm performs slightly better. A combined result, taking the least C_v from the two methods, leads to a result of 90% of very well-positioned grids. Note that the optimized algorithm does not affect cells that intercept deleted bars of the grid (Fig. 7).

Theoretically, the ROI ratio of Malassez slide should be 0.800. In our previous work, we found a peak located at 0.803 in ROI distribution (Fig. 9).

This discrepancy is statistically significant and is confirmed with the optimized algorithm: a Student compliance test (Dagnelie, 2011) with respect to the theoretical ratio (0.800) was performed on the means of the original and optimized algorithms. The confidence intervals of both means were computed, and the results of the tests are summarized in Table 2. Moreover, a Student paired test (Dagnelie, 2013) between original and optimized algorithms did not reveal any difference between the means ($T_{\text{cal}} = 0.7121$, $df = 133$, $\Pr(> |T_{\text{cal}}|) = 0.4776$). This clearly shows that the Malassez slide used in these experiments has a somewhat biased geometry.

In order to confirm that this discrepancy can be explained by standard tolerances in the building process of Malassez slides, we ran the optimized algorithm on four different models of Malassez slides from three brands and we observed a specific discrepancy for each one (see Fig. 10). Three trademarks were used in the present study: Marienfeld, Poly Labo, and Preciss. Note that two independent Poly Labo slides were taken into account (Poly Labo A and Poly Labo B). The Preciss chamber is composed of one grid square whereas Marienfeld and Poly Labo chambers are composed of two grid squares (in these cases only one grid was used to count yeasts). The Marienfeld chamber is quite different from other slides because the contrast is increased by the presence of a mirror under the grid square. Although some differences occur between the slides the sizing does not vary from one counting chamber to another. We could deduce that the optimized algorithm is sensitive enough to allow discrimination between slides models.

CONCLUSION AND FURTHER WORK

In this work, we proposed an improvement on a previously described method. We used the same criterion of quality as in the previous method and measured the accuracy of grid positioning (C_v). By combining optimized and original algorithms, we obtained a mean improvement of 25.5% and eliminated all cases of failure. We increased from 70 to 80% the proportion of very good results and found that combination of the two methods can lead to a result of 90% of very good results.

The preprocessing and the deletion of grids produces very clean images. We have started further work showing that the use of these processed images really facilitates cell segmentation. We also determined that this optimized method is sensitive enough to distinguish different Malassez slides models.

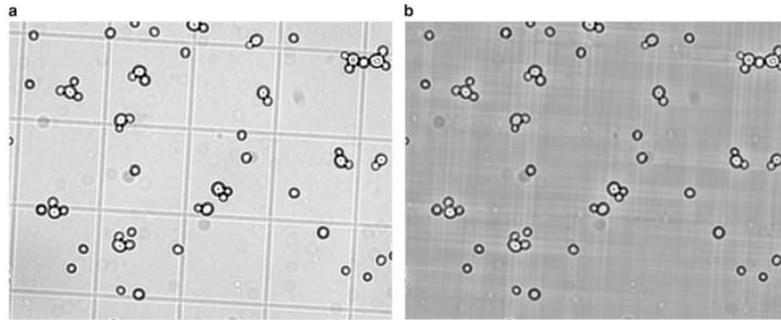


Figure 7. a: Original image, (b) image with deleted grid.

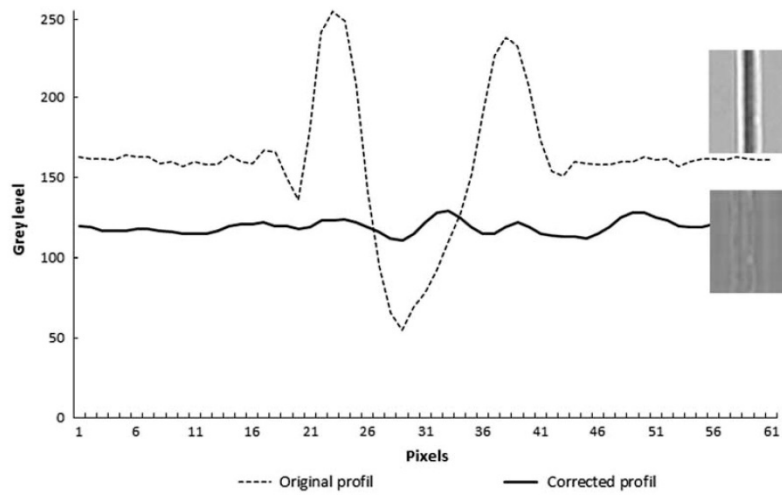


Figure 8. Gray levels along a bar profile in original and corrected image.

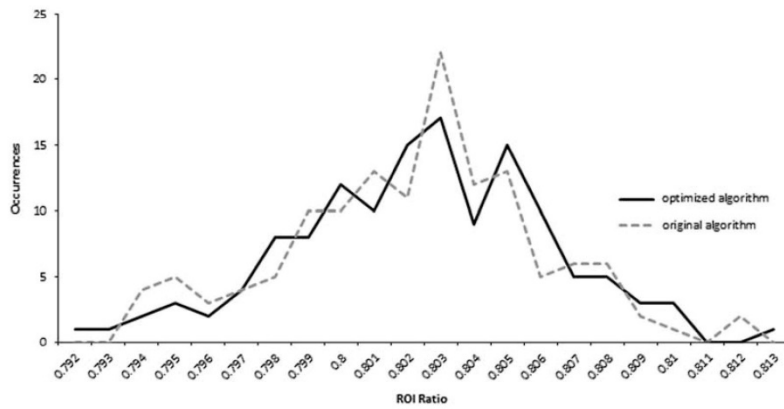


Figure 9. Distribution of ROI ratio for 135 images sampled. ROI, region of interest.

Table 2. Student Compliance Test for the Observed Means for Width-to-Length Ratio.

	Mean	CI	T_{cal}	$\Pr(> T_{cal})$
Original algorithm	0.8021	[0.8014 0.8027]	6.12	9.6672e-09
Optimized algorithm	0.8024	[0.8017 0.8030]	7.18	4.4673e-11

CI, confidence interval.

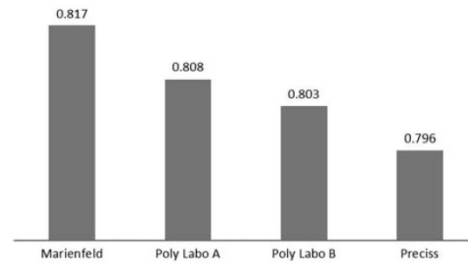
Successively: Observed means, 95% CI for theoretical means, calculated Student t 's, and probabilities of observing such or greater t values under the null hypothesis "theoretical mean = 0.8."

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Pierre André Maréchal, Christine Le Noan and Laurence Dumas for promoting the development of this work, and to the DSI/CCUB staff of the Burgundy university for the help on Matlab® software use.

REFERENCES

- BARGOUGUI, A., LE PAPE, P. & TRIKI, S. (2013). Antiplasmodial efficacy of fruit extracts and cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *J Nat Sci Res* **3**, 31–37.
- DAGNELIE, P. (2011). *Statistique Theorique Et Appliquee Vol. 1—Statistique Descriptive Et Bases De L'inference Statistique*, 3rd ed. Paris, Bruxelles: Département de Boeck université.
- DAGNELIE, P. (2013). *Statistique Theorique et Appliquee Vol. 2—Inference Statistique a Une et a Deux Dimensions*, 3rd ed. Paris, Bruxelles: Département de Boeck université.
- KOVESI, P. (1999). Phase preserving denoising of images. *Signal* **4**, 1.
- MAI, H., MORIN, B., PARDON, P., GONZALEZ, P., BUDZINSKI, H. & CACHOT, J. (2013). Environmental concentrations of irgarol, diuron and

**Figure 10.** Measured ROI by Malassez slides model. ROI, region of interest.

- S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Environ Res* **89**, 1–8.
- MARIN, A., DENIMAL, E., GUYOT, S., JOURNAUX, L. & MOLIN, P. (2014). A robust generic method for grid detection in white light microscopy Malassez blade images in the context of cell counting. *Microsc Microanal* **21**, 239–248.
- PHILIPPE, D., STANISLAS, D.B. & CLAUDE, M.A. (2014). Isolation and screening of yeast strains involved in performing of traditional production process of cassava bioethanol. *Int J Curr Microbiol App Sci* **3**, 671–684.
- VALQUE, H., GOUYER, V., GOTTRAND, F. & DESSEYN, J.-L. (2012). MUC5B leads to aggressive behavior of breast cancer MCF7 cells. *PloS One* **7**, e46699.
- VOICU, L.L., MYLER, H.R. & WEEKS, A.R. (1997). Practical considerations on color image enhancement using homomorphic filtering. *J Electron Imaging* **6**, 108–113.
- WILLIAMS, D.B. & MADISETTI, V. (1997). *Digital Signal Processing Handbook*. London: CRC Press, Inc.

c. Automatic biological cell counting using a modified gradient Hough transform

Cet article présente notre problématique biologique nous amenant à vouloir automatiser les comptages de cellule.

Nous présentons ici les problématiques d'imagerie et les solutions innovantes que nous avons amené pour y répondre.

Nous détaillons les apports des structures mises en œuvre, les LCL et les UCM, en particulier en terme de précision et de robustesse par rapport aux méthodes classiques.

Cet article conclue les travaux concernant le comptage des cellules sur lame de Malassez : Nous sommes en mesure de proposer une méthode complète, fiable et robuste pour effectuer automatiquement ces comptages.

Nous sommes actuellement dans la phase finale de rédaction d'un nouvel article utilisant les résultats de ces comptages mais axé sur les problématiques biologiques.

Automatic Biological Cell Counting Using a Modified Gradient Hough Transform

Emmanuel Denimal,^{1,*} Ambroise Marin,¹ Stéphane Guyot,¹ Ludovic Journaux,^{1,2} and Paul Molin¹

¹AgroSup Dijon, Université Bourgogne Franche-Comté, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

²AgroSupDijon, Université Bourgogne Franche-Comté, Le2i FRE2005 F-21000 Dijon, France

Abstract: We present a computational method for pseudo-circular object detection and quantitative characterization in digital images, using the gradient accumulation matrix as a basic tool. This Gradient Accumulation Transform (GAT) was first introduced in 1992 by Kierkegaard and recently used by Kaytanli & Valentine. In the present article, we modify the approach by using the phase coding studied by Cicconet, and by adding a “local contributor list” (LCL) as well as a “used contributor matrix” (UCM), which allow for accurate peak detection and exploitation. These changes help make the GAT algorithm a robust and precise method to automatically detect pseudo-circular objects in a microscopic image. We then present an application of the method to cell counting in microbiological images.

Key words: microscopy, cell, counting, hough, circle

INTRODUCTION

The goal of our project is to automatically detect, count and characterize cells in biological microscopic images, in very different conditions, with very low prior knowledge and zero or minimal manual settings. Figure 1 shows a sample illustrating the variability of the images that we examined for this project. The challenge was to build a robust algorithm which could work accurately, whatever the viewing conditions and the quality of the image, without manual settings.

Preliminary studies have shown that classical algorithms have trouble in some common situations in microbiology. For example, budding cells, agglomerated cells, cells with soft edges are difficult to detect accurately. In the context of cell counting in microscopic image analysis, the classic algorithms used in biology laboratories, implemented, for example, in the ImageJ software application (Lehmussola et al., 2006; Cai et al., 2011; Kumagai & Hotta, 2012), are not robust enough with respect to inter-image variability. This forces biologists to manually customize the software settings or algorithm parameters for almost every image or series of images. This has a direct impact on the reliability of cell counting and prevents its automation.

In order to improve the automation of cell counting, we suggest modification of the Gradient Accumulation Transform (GAT) method presented by Kierkegaard (1992) and used by Kaytanli & Valentine (2013). This method is based on three ideas. First, a pixel of the image is suspected to be the location of a cell edge if, at this point, there exists a gradient. But this is only a suspicion. The reverse is not true. The existence of a gradient at a point does not necessarily

imply a cell edge. Second, two neighboring points belonging to the edge of a cell have almost the same tangential profile, so that if a tangential gradient exists, it is very weak. The gradients in these neighboring points are both oriented toward the center of the cell. Third, if we draw the straight lines underlying the gradients, they intersect at the center of the cell. So if a point is the locus of many gradient intersections, it is very likely to be the center of a cell. In differential geometry, this method is analogous to the search for centers of curvature, i.e., calculating the evolute of a curve. In classical methods, those intersections for each relevant gradient in the image are counted and reported in an accumulation array A , which is called the parameter space or voting space. Figure 2 shows a summary of these ideas.

The problem of the construction of A has been studied by Cicconet et al. (2015). These authors compared four methods of accumulation: constant real weighted accumulation, constant real unweighted accumulation, complex weighted accumulation, and complex unweighted accumulation. They concluded that the complex weighted accumulation method give the best results for their application. It seemed to us that such a weighting choice might decrease the sensibility of the method, especially in cases of heterogeneous cell contrasts. In other words, to detect circular objects with low contrast, using gradient amplitude for the increment can lead to an unsuccessful detection.

The idea of using gradients to determine and characterize circles in an image is not new. In Liu et al. (2011), the authors present a method to vectorize images and find arcs. The centers of circles are defined as intersections of gradients. In Rad et al. (2003), the authors develop a method of preprocessing images to detect circles brighter or darker than the background. The method is based on the study of opposite gradient pairs. The concept of discrete evolute curve

Received July 12, 2016; accepted November 30, 2016

*Corresponding author. emmanuel.denimal@agrosupdijon.fr

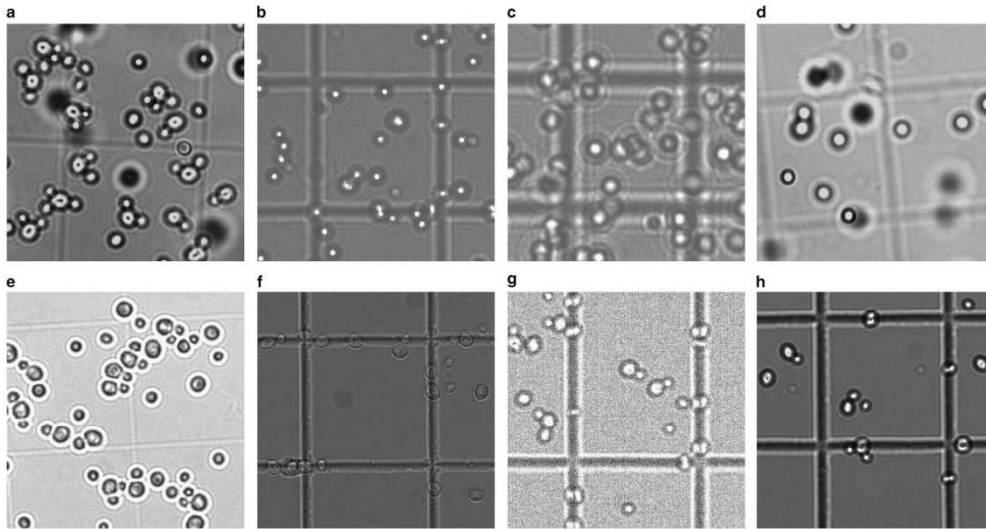


Figure 1. Grayscale images of yeasts sandwiched between a Malassez grid and a coverslip. **a,h:** budding cells. **b,c:** High glycerol concentration, **(d)** bad sedimentation, **(e)** yeasts clusters, **(f)** low contrast, **(g)** electronic noise.

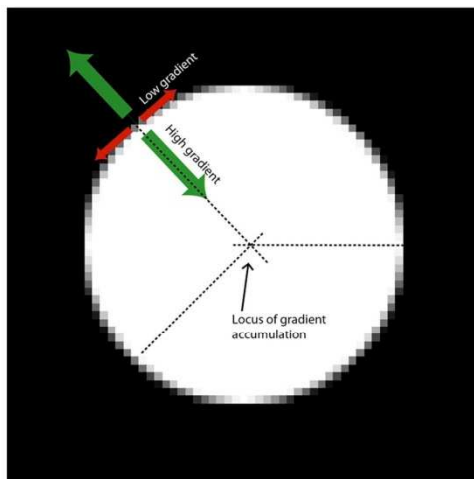


Figure 2. Underlying ideas of gradient accumulation method.

was also described in Tao et al. (2008), where the authors follow the arcs in the processed image, and determine the centers of curvature by least square fitting. The stationary points of this algorithm are the supposed centers of circles. Gradients were also used in an iterative method to determine the centers of circles in semi-conductor images (Timm & Barth, 2011). In Kierkegaard (1992), the author gave a clear definition of the so-called gradient accumulation method.

Most of these Circular Hough Transform (CHT) methods use common steps. For example, to achieve contour detection in original image, a Sobel filter is used (Davies, 2004). Then, to find peaks in the accumulation array (also called voting space, parameters space, accumulator, etc. in the literature), the traditional methods use a threshold based on the maximum value of this array (a peak). Using global thresholding, can lead to non-detection of the lowest peaks. Some algorithms use an iterative process for searching peaks, using a mask at each step to overshadow the current peak in order to find the next maximum value in the array. Choosing the right size for this mask is not easy. Using a too large mask can eliminate a neighboring peak and lead to not detect a existing cell (case of budding cells). Conversely, a too small mask can lead to false positives by detecting a part of a previous peak.

Our algorithm is mainly based on the accumulation of gradients, as described in Kierkegaard (1992) and Timm & Barth (2011). The first modification that we introduce is the use of a first-order derivative of a two-dimensional (2D) Gaussian distribution, instead of the Sobel filter. This choice allows an improved extraction of gradient information in the case of fuzzy edges.

The second modification consists in introducing and using new data structures we call local contributor list (LCL) and used contributors matrix (UCM). For each point of the accumulation array, resorting to its contributors enriches the information associated with each candidate center. This introduces an alternative to the thresholding and masking in order to find relevant maxima in the accumulation array. The intake of this algorithm is its

sturdiness regarding viewing conditions (Figs. 1c, 1d, 1f, 1g), object density (Figs. 1a, 1e) and budding phenomena (Figs. 1a, 1e, 1h).

The following pages are structured as follows. First, we will explain in detail the data structures we used: accumulation matrix, LCL, and UCM. Second, we will present our main contribution, namely, how to exploit these data structures by introducing new methods made possible by LCL and UCM. Third, we will describe the application to yeast cell counting in white light microscopy, and finally, a statistical study of “human versus automated” cell counting [“Daneel” counting (Asimov, 1954)] is presented.

METHODS

Data Structures

Accumulation Array

We adopt the paradigm shift proposed by Cicconet et al. (2015) and use complex numbers, whose phases are established in $[0, 2\pi]$ along the radius range, instead of integers, in the accumulator array. The idea is that the intersections of gradients that are not of the same circle, will certainly be out of phase and will be canceled, thus reducing the intensity of the background noise in the accumulator. We tested our application to determine if introducing unweighted complex phase coding along the radius range increases the peak signal-to-noise ratio in A .

We denote I the bitmap array of the original grayscale image. The accumulation array A is a matrix of integers of the same size as I , initially set to 0. For each pixel (i, j) of the image I , the gradient direction is computed and a straight line segment Δ_{ij} is drawn in this direction. This segment is discretized in the accumulation array A by the Bresenham algorithm (Bresenham, 1965), resulting in a set of points $\Delta_{ij}^d = \{(k_{ij}, l_{ij}) \in A\}$. In order to optimize this building process, and minimize noise in A , we use the Otsu method (Otsu, 1975) to retain only those gradients with significant module values. Each corresponding element $A(k_{ij}, l_{ij})$ receives an increment ξ_k [see formula (1)], except for the origin of the gradient.

$$\xi_k = e^{2i\pi k/N} \quad (1)$$

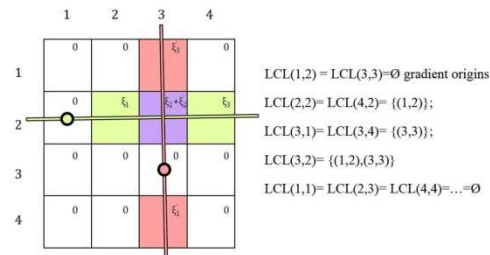


Figure 3. Left: accumulation array values, lines from gradient vector, and gradient origin points (bold circles). Right: corresponding local contributor list (LCL).

where k is the discretized distance index along Δ_{ij}^d and N is the cardinal of Δ_{ij}^d (see Fig. 3).

Local Contributors List (LCL)

A list Local Contributors List (LCL) (k, l) is linked to each point (k, l) of the accumulation array A in the following manner: during the accumulation process, for each point (k, l) , the corresponding list $LCL(k, l)$ is filled with the coordinates of the points (i, j) , (i, j) being the coordinates of the gradient (Δ_{ij}) accumulation source at point (k, l) :

$$LCL(k, l) = \{(i, j) / (k, l) \in \Delta_{ij}\} \quad (2)$$

Used Contributors Matrix (UCM)

UCM is a matrix of integers of the same size as the image. During each iteration, for the maximum value in accumulation array A (a peak), the corresponding LCL is analyzed: at each contributor's coordinates, the UCM cell is filled with the current peak number if not already assigned (see Fig. 5).

Obtaining and processing images

Yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171 were exposed to different levels of osmotic pressure ranging from 1.38 to 16.5 MPa in the presence of glycerol (to adjust osmotic pressure) and nutrients, then sandwiched between a Malassez grid and a coverslip. After 3 min of preparation (to allow yeast sedimentation), yeast cells were visualized by using an upright microscope (AxioPlan 2imaging; Zeiss, Marly le Roi, France) equipped with a black and white camera (AxioCam MR; Zeiss) driven by the AxioVision Rel 4.8.0.0 software (Zeiss). A $\times 63$ objective was used to observe cells. Low-quality images (i.e. blurry images) and images out of focus (i.e., yeasts and Malassez grid were not always in the same focal plane) were recorded. The quality of these images may be related to the presence of glycerol and more particularly to light scattering in the water/glycerol solution as well as to low yeast sedimentation or poor operator ability.

At this point, the images are processed to eliminate noise and brightness anomalies. We remove also the underlying Malassez grid which is a troublesome artefact for cell segmentation and counting in microscopic images (Denimal et al., 2015).

General Overview of the Algorithm

The main loop of the algorithm is presented in Figure 4. Each step will be subsequently detailed.

Building the Gradient Field, the Accumulation Array A and Determining Stopping Criterion (Step 0)

Most of classical CHT implementations use a Sobel filter to determine the edges in I . This filter is efficient on sharp edges, but fails to be accurate in case of fuzzy borders. If cells in the image I are out of focus for any reason, a classical CHT implementation will miss some detections. To avoid this

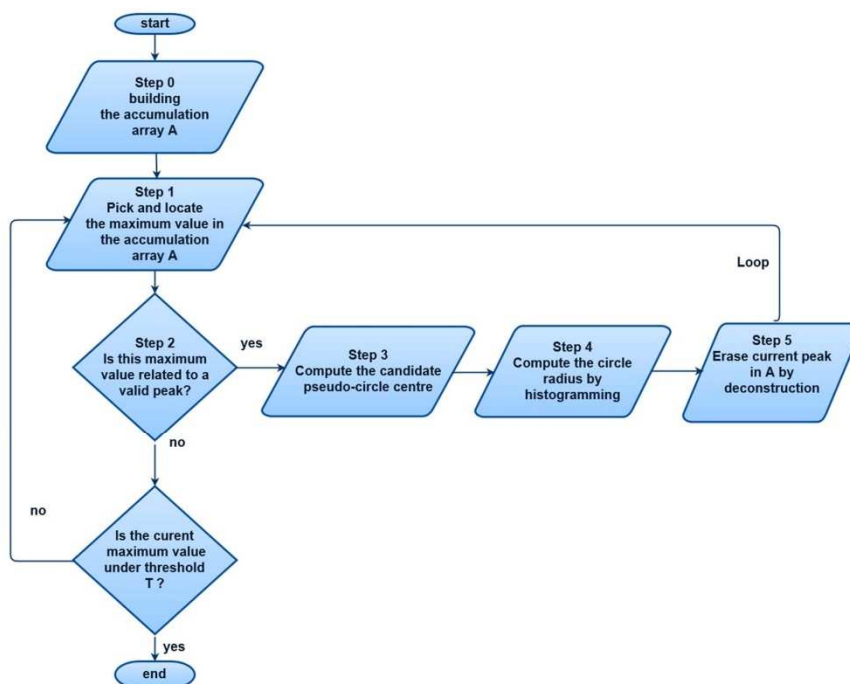


Figure 4. Algorithm main loop.

problem, we propose to use a convolution with a kernel from the first-order derivative of a 2D Gaussian, allowing an improved treatment of fuzzy edges.

From this vector field, we then compute A and $|A|$ as described in section data structures. Using $|A|$ we then determine a stopping criterion T .

In the literature, this threshold T is commonly determined by choosing a percentage of maximum values in the accumulator matrix (Davies, 2004). This may lead to the arbitrary loss of the weakest peaks in the accumulator. We propose a different approach in order to provide an estimation of accumulator background noise, which is not defined *a priori*, but calculated. The main idea here is, that if an accumulator peak exists, the points that have contributed to build it are unlikely to be peak locations. So, accumulator values at these locations should not be characteristic of a peak value. The method is the following: we first select in the LCL all the contributors of the considered peak and retrieve the values of those contributors in the accumulator.

We then compute T , using the interquartile range (IQR): $T = Q3 + W \times \text{IQR}$ where $W = 1.5$ as is common in outlier detection (McGill et al., 1978) and $\text{IQR} = Q3 - Q1$, $Q1$ and $Q3$ are, respectively, the first and the third quartiles of the distribution of $|A|$. Thus, the condition $\max(|A|) < T$ will provide a stop criterion for the main loop.

Picking and Locating the Maximum Value in the Accumulation Array A (Step 1)

Finding the maximum value and its location in the accumulation array $|A|$ is trivial. This maximum defines a peak and, prior to any other analysis, the challenge is to decide if that peak is potentially generated by a circular shape in the original image or is only an artefact.

Validating a Peak by Using UCM (Step 2)

The CHT has accuracy limits when searching for a wide range of radii. A wide range of radii may generate many false positives or missing detections. In its Matlab R2014b[®] implementation, the *imfindcircles* documentation suggests choosing a radius range (measured in pixels) such that

$$R_{\max} < 3 \times R_{\min} \wedge (R_{\max} - R_{\min}) < 100 \quad (3)$$

This can be an issue when searching for circular objects without previous knowledge of their size, for example, in the case of budding cells in yeast microscope images or cells from different species.

Our algorithm does not need *a priori* knowledge of an object's size. It overcomes this limitation, while retaining its accuracy, by the combined use of GAT, LCL, and UCM. It proceeds as follows: for the candidate peak number N

0	1	1	1	0	2	2	2	0
1	0	0	0	1	0	0	0	2
1	0	P ₁	0	1	0	P ₂	0	2
1	0	0	0	1	0	0	0	2
0	1	1	1	0	2	2	2	0

Figure 5. Used contributor matrix with two peaks P_1 , P_2 , and their contributors $F_1 = 100\%$ $F_2 = 75\%$.

named P_N , a freshness coefficient F_N is calculated as the ratio between the numbers of P_N , contributors having the value N in the UCM, and its total number of contributors:

$$F_N = \frac{\text{card}\{C_N = N\}}{\text{card}\{C_N\}} \times 100 \quad (4)$$

where C_N is the set of contributors of P_N .

As illustrated in Figure 5, the peaks P_1 and P_2 are characterized, respectively, by 100 and 75% freshness.

A peak P_N with a freshness coefficient above 50% is considered as valid and added to the peak list. A peak P_N with a freshness coefficient below or equal 50% is considered as probably linked to a previous peak P_K , $K < N$. This parent peak P_K is that which shares in UCM the maximum number of contributors with P_N . The value UCM (P_N) is then set to P_K .

Accurately Computing the Candidate Pseudo-Circle Center and Its Radius (Steps 3 and 4)

The highest accuracy in calculating the center coordinates is crucial for the future characterization of the circle. As shown in Figure 6, $A(i, j)$ is not always the actual center of the circle we are seeking. In most cases, the geometrical center of the circle does not fall exactly in the center of a pixel. Therefore, the adjacent elements of $A(i, j)$ in the accumulation array contain useful information about the true location of the center. Let $V(i, j)$ be a set of cells in the neighborhood of (i, j) defined as follows:

$$V(i, j) = \{(k, l) / d((i, j), (k, l)) < \delta \ \& \ A(k, l) > \sigma \times A(i, j)\} \quad (5)$$

where δ is the neighborhood radius, d defines the Euclidian distance, and σ is a coefficient of eligibility in the neighborhood. The threshold of σ is defined “experimentally” as that which gives the best performance in our sample. An estimation of the centroid is then computed with a sub-pixel precision by taking the barycentre of the points belonging to $V(i, j)$, weighted by their values in A . In this application, these parameters are set to $\sigma = 0.55$ and $\delta = 2.5$. This calculation step could be related to the update step of the mean shift algorithm as described in Comaniciu & Meer (2002). We do not use the complete iterative process of the mean shift, as we have already found the maximum value pixel in the accumulation array (the feature space).

At this point, we determine the radii of the circles related to this center. We do this by using the information from the merged LCL of the $V(i, j)$. We can therefore compute a

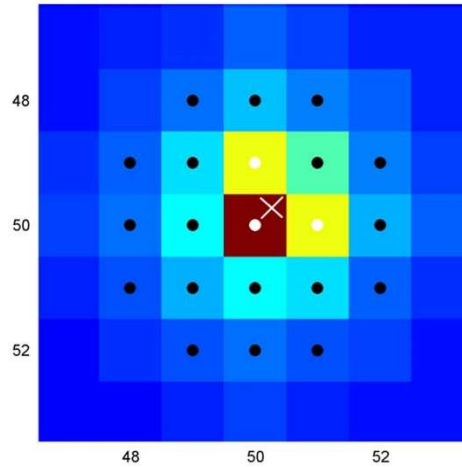


Figure 6. Part of the accumulation array A , the black dots are the neighborhood, the white dots are $V(i, j)$, the white cross is the geometrical center of the circle calculated as the barycentre of the $V(i, j)$.

radial and an angular histogram as described in Kierkegaard (1992) and determine the radii of the circles, even those which are concentric or fragmented.

Erasing Current Peak in the Accumulation Array A (Step 5)

A classical way to erase a local maximum is to define an exclusion zone around the highest peak and continue iteratively until the next peak intensity is below a fixed threshold (Kaytanli & Valentine, 2013, see also, the function *findpeaks* of Matlab).

The method proposed here uses a causal approach: we locally apply the reverse process of accumulation. Namely, the LCL provides all the contributors for each point of A . So, for each contributor (i, j) of the peak at (k, l) to be removed from A , a straight line Δ is drawn along the gradient direction at this contributor's coordinates. This line is digitized in the accumulation array A by the Bresenham algorithm (Bresenham, 1965), resulting in a set of couples $\{(i, j) / (i, j) \in \Delta\}$. Each corresponding element $A(i, j)$ receives a weight decrement equal to its original increment. We call this clean removal process the deconstruction of the accumulation array. Deconstruction involves an additional computation cost, but leads to more accurate detection, particularly in the following cases: two almost concentric circles or a large circle close to a small one as shown in the next section.

RESULTS

Benchmarking the Algorithm on Synthetic and Microbiological Images

In our observations, we identified several difficulties that needed to be overcome in order to count yeast centers

precisely and automatically. We produced synthetic images presenting those typical difficulties and we compared our method with the Matlab® function *imfindcircles* which implements a classic CHT. We are aware that it is possible to adjust *imfindcircles* settings in order to produce very good results, but this requires prior knowledge of the radius range and a fine tuning for each case. Our algorithm does not require such prior knowledge. In the following examples, we systematically apply the same set of parameters to the two methods. These parameters were chosen so that all objects could be found whatever their size.

Budding Cells and Cell Clusters

In this example, Figure 7 represents budding yeasts or cell clusters on which we try to avoid spurious circle detection (Figs. 7c and 7f). Our method provides the exact count (Figs. 7b and 7e).

Object Contrast (Strong versus Weak in the Same Image) and Size Variability

This test image represents either a cell with its nucleus or a small cell in front of a bigger one in low contrast conditions. Our algorithm works by not weighting the vector gradient by its module, and by deep exploration of the accumulation array. The method presented finds both circles (see Fig. 8).

Accurate Separation of Quasi Concentric Circles

The accurate separation of almost concentric circles is important in cell counting applications because the cells may

overlay or touch each other. In this case the proposed method of accumulator deconstruction succeeds in finding both circles (see Fig. 9).

Application to Yeast Counting Comparison of Performances Between the Algorithm and a Sample of Human Counters

We selected a sample of 13 images in our panel, and aggregated one simulated image, in order to check the conformity of the algorithm (named “Daneel” in Table 1; see Supplementary Material). In total, 14 human counters were involved. A test was first performed for each image, in order to verify the conformity of the “Daneel” scores to the mean of the human counters. As seen in Figure 10, the conformity is verified for all the images (even IM4), the score of the algorithm falling within the 95% confidence interval of the human counting.

Supplementary Material

Supplementary Material can be found online. Please visit journals.cambridge.org/jid_MAM.

A principal component analysis (PCA) was then performed in order to locate the automatic counting among human counts. The graph of counters (Fig. 11, see also the Table 1) shows that there is an important variability between human counters. The complexity of some images (e.g., IM5 and IM12) mainly explains this variability. The main axis of the PCA should be interpreted as the consensus about the

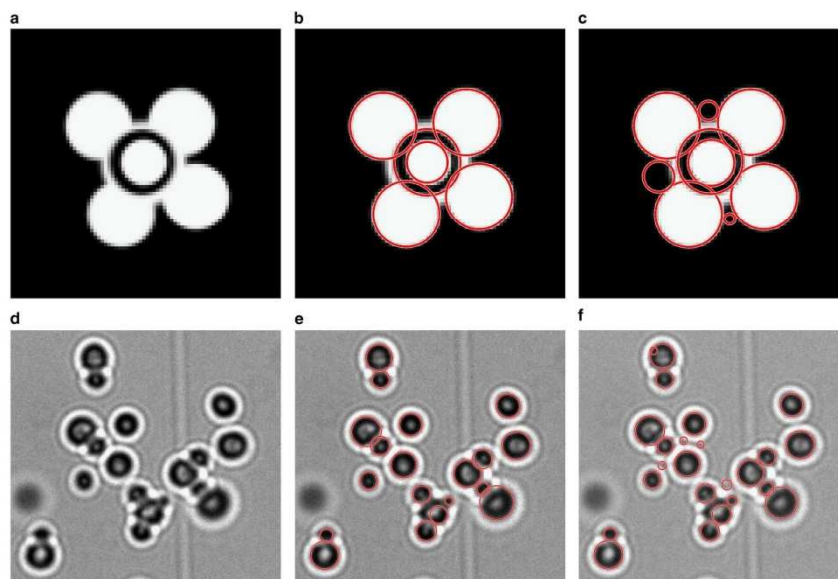


Figure 7. (a) Artificial grayscale image of budding cells and clusters, (d) real image of budding cells and clusters, (b,e) circle detection using our method, (c,f) circle detection using *imfindcircles*.

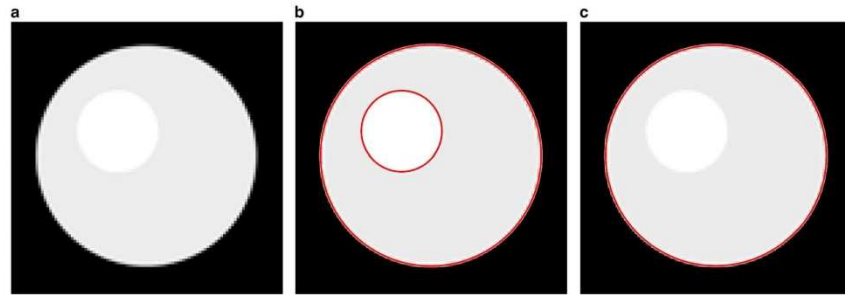


Figure 8. a: Artificial grayscale image with two circles: one with a gray value of 255, the other with a gray value of 235 (b) circle detection using our algorithm (c) circle detection using *imfindcircles*.

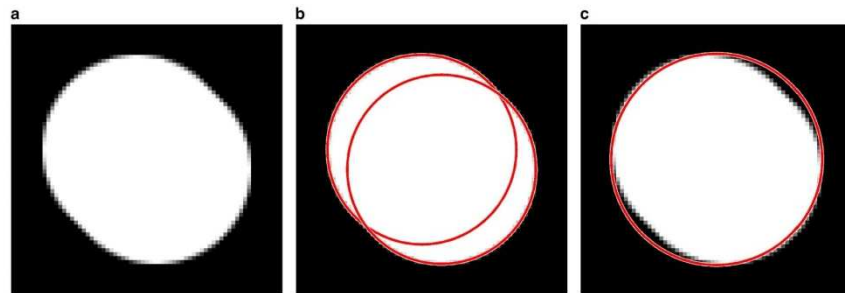


Figure 9. a: Artificial grayscale image with two circles: one centered on x, y , the other one having the same radius at center $x + 5, y + 5$ (b) circle detection using our algorithm (c) circle detection using *imfindcircles*.

number of cells counted. The counters who underestimate the number of cells should be located on the left and those who overestimate, on the right. An interesting fact is that most counters on the right of the figure are non-biologists,

whereas most of the counters on the left of the diagram are biologists, which means that hard scientists are less accustomed to visually rejecting the bodies appearing as artefacts. The performance of the algorithm is located slightly on the

Table 1. Human and Automatic Counting for 13 Selected Images.

Images	Nomenclature ^a	Pablo	Manu	Ambroise	Steph	Chris	Jean	Adrien	Paul	Mélanie	Ludo	Sarah	Alex	Jennifer	Chloe	Danel
IM1	1.38 R2 1	97	98	95	89	70	109	82	78	82	98	84	98	89	119	89
IM2	1.38 R3 1	85	89	86	59	78	88	79	69	78	85	78	83	71	87	81
IM3	1.38 T1 1	77	78	79	66	75	83	63	61	63	79	66	62	66	84	73
IM4	1.38 T1 3	76	92	88	78	82	88	74	69	74	76	78	75	70	93	63
IM5	10.5 R1 1	64	66	64	56	62	67	63	53	62	66	66	65	64	68	63
IM6	10.5 R2 2	220	242	243	222	228	210	170	152	187	241	205	220	200	222	221
IM7	10.5 T4 1	22	22	24	21	20	22	22	22	22	23	21	21	18	22	21
IM8	10.5 T4 5	44	49	49	46	42	50	42	44	45	54	47	47	43	55	45
IM9	16.5 T4 3	169	176	176	155	150	176	153	165	166	172	162	152	154	176	159
IM10	9 R1 1	234	243	232	211	227	232	207	184	213	236	242	243	210	248	224
IM11	9 R4 2	115	120	130	115	116	130	90	88	98	121	118	98	88	122	115
IM12	9 R4 3	102	108	113	112	105	101	85	90	96	105	104	93	86	105	107
IM13	9 T3 3	314	343	338	287	236	341	264	255	292	292	311	316	275	350	262
Simulation		30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

The last image was obtained by numerical simulation. It was included in the sample only for coherence verification, and was thus not taken into account in the principal component analysis.

^aSee Supplementary Material.

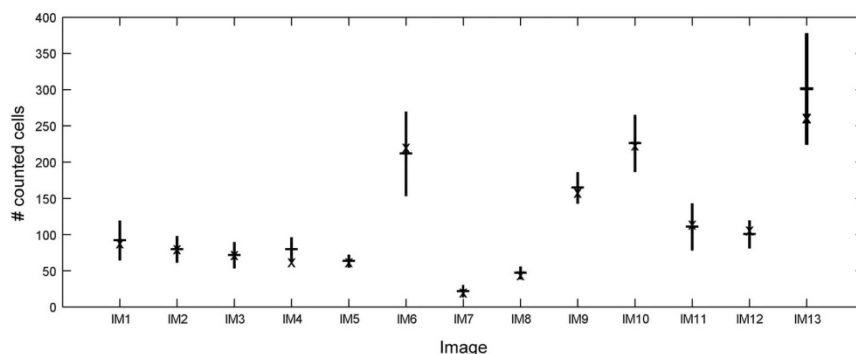


Figure 10. 95% confidence intervals of human counting (lines) and “Daneel” scores (X). The signs plus (+) indicate the means of human counters.

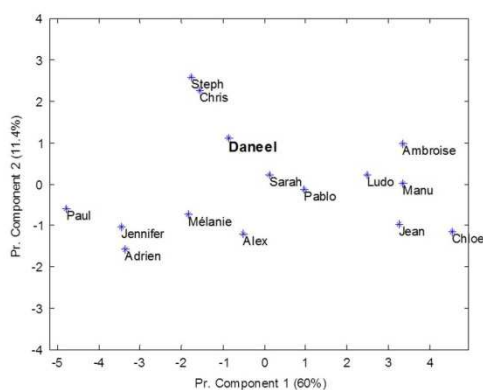


Figure 11. Principal component analysis of human and automatic counting.

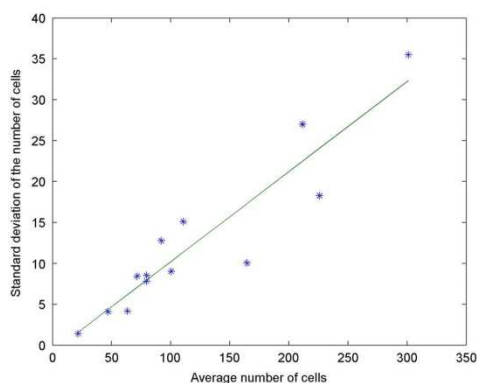


Figure 12. Counted number of cells, standard deviation versus means.

left. The algorithm thus seems to have a “biologist’s” eye, which is a good point. The algorithm appears to be an efficient and reliable compromise to implement automatic counting in a research laboratory.

DISCUSSION

The Issue of Ground Truth

Our experiments show that the ground truth for the number of cells is not a trivial parameter to retrieve. As shown in Table 1 (see also Fig. 10), there exist images where manual counts reach a quite a clear consensus which can be considered as the ground truth. Nevertheless, for some others, this consensus is more disputable. Figure 12 represents the standard deviation of manual counts versus their means. It indicates that, as the standard deviation increases with the number of cells, the consensus becomes less clearly definable.

Daneel Robustness versus Classical CHT (*imfindcircles matlab*)

In order to test the genuine robustness of our method versus classical CHT, we performed some tests. Considering the variability of the ground truth, we first chose a synthetic image where the ground truth is known by its construction (18 circles, Fig. 13a). For the choice of a biological image, according to our problematics, we selected from our sample an image with counting difficulties and then cropped an area where it was possible to determine an objective ground truth (35 cells, Fig. 13c). With three different methods, we have then counted for each image the false positives and true negatives then calculated the recall, the precision and the F-Measure.

The first method is our algorithm (called Daneel). The second method is *imfindcircles* with “dark polarity” setting and phase code algorithm. The third method is *imfindcircles* with “light polarity” setting and phase code algorithm.

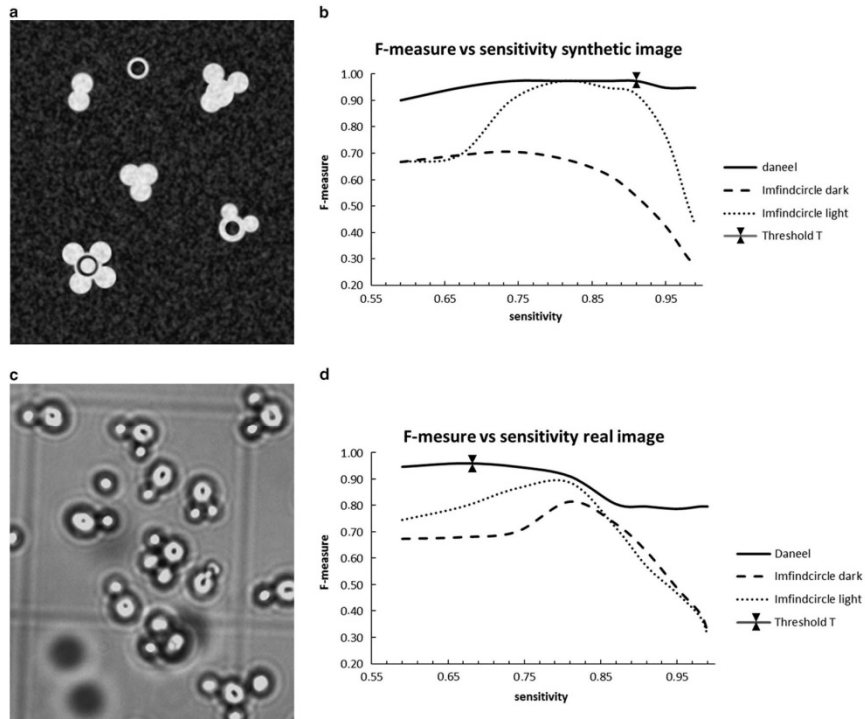


Figure 13. *F*-measure/sensitivity and the threshold *T* for (a) synthetic image, (b) quality of circle detection and *T* evaluation on image (a,c) Microscopic image of yeasts, (d) Quality of circle detection and *T* evaluation on image (c).

For all methods, we selected a radius range large enough to include all detectable objects. Finally, to measure the influence of the threshold *T*, we made those countings with *T* varying from 0.5 to 0.99. We decided to compare with the “phase code” option of *imfindcircles* because in the paradigm, it is very close to our algorithm.

We established the equivalence between our *T* threshold and the parameter “sensitivity” of *imfindcircles* by the relation in the following equation:

$$\text{sensitivity} = 1 - T / \text{MAX}(A) \quad (6)$$

The results are presented in Figure 13.

By analyzing those graphics, we can notice that:

First, the method Daneel is as good as or better than the other two.

Then, due to UCM, freshness and linkage to previous peaks, Daneel is more robust at high sensitivities and produces fewer false positives. This feature is critical for weak relevant peaks detection (e.g., in the case of images showing budding cells, see Fig. 13c).

Finally the *T* threshold, determined automatically by using LCL, is always very close to the observed optima (Figs. 13b, 13d).

Iterative Peak Erasing: Relevance of LCL Usage Comparing to Neighborhood Punching (Exclusion Zone)

In the iterative process of peak finding, once a peak has been identified as a relevant one, it has to be erased from the accumulation matrix to allow the search for the next peak. The usual method for peak erasing is to set to 0 the surrounding area. This area can be defined as a square, a disk or by a threshold (e.g., percentage of the maximum peak value). Those erasing methods present a clear advantage in terms of computation speed. Nevertheless, for our applications, there are some major drawbacks. Using a neighborhood punching area is a drawback in case of almost concentric circles which produce close peaks in accumulation matrix. Erasing the neighborhood of the first peak will erase the second one (see Fig. 14 lower row), whereas the deconstruction process does not have this disadvantage (see Fig. 14 upper row). Furthermore, it can be noticed that masking area techniques induce two false positives and a misplaced center. Another example is illustrated by Figure 7, where the accumulation process has generated “ghost peaks” between budding cells. These artefacts are eliminated by the deconstruction method, but not by the classical CHT.

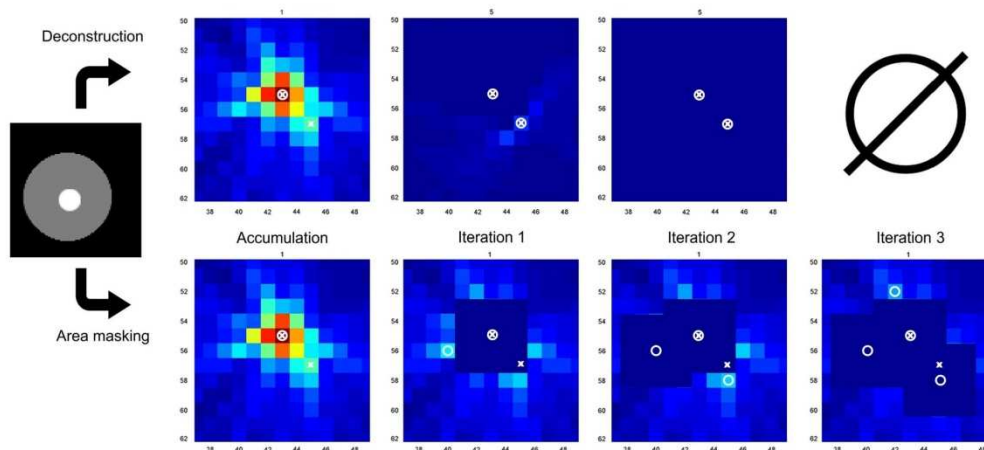


Figure 14. Comparison between deconstruction and masking area methods. White crosses represent actual centers and white circles represent centers found during the iterative process. Empty symbol means that the deconstruction algorithm has terminated.

Computational Considerations

We have established a calculation time estimate [formula (7)] depending on the image size (I), on the number of cells (n), and on the radius range (R):

$$f(I, n, R) = \alpha I + \beta n R^2 + \gamma I n^2 R^2 \quad (7)$$

The constants α , β , and γ depend on the power of the computer. The third term of the equation $\gamma I n^2 R^2$ is mainly induced by the iterative step of deconstruction. Nevertheless, algorithmic shortcuts and optimizations could be obtained by parallelization and/or vectorization of the code. Due to this complementary term, our method is slower than traditional CHT methods. This is a price that seems fair given the gains obtained in robustness and accuracy.

CONCLUSION

In this article, an automatic method for circle detection and counting, based on the Gradient Hough Transform (GHT), was described. The method introduces two data structures to improve robustness and automation of the GHT. An application to yeast cell counting was presented. The method was assessed in comparison with human counting and was statistically proven as reliable as a skilled biologist. We identified one of the method limitations, namely the determination of the T threshold. Further research should therefore be dedicated to a theoretical understanding of the accumulator and to the computation of the best T -value. Other applications deserve consideration as well, we obtained promising results from preliminary tests in the field of viticulture to survey grapes or in microbiology to detect contaminations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Christine Le Noan and Laurence Dumas for promoting the development of this work, and to the DSI/CCUB staff of the Burgundy university for the help on Matlab® software use.

REFERENCES

- ASIMOV, I. (1954). *The Caves of Steel, A Robot Novel*. Garden City, NY: Doubleday.
- BRESENHAM, J.E. (1965). Algorithm for computer control of a digital plotter. *IBM Syst J* **4**, 25–30.
- CAI, Z., CHATTOPADHYAY, N., LIU, W.J., CHAN, C., PIGNOL, J.-P. & REILLY, R.M. (2011). Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting. *Int J Radiat Biol* **87**, 1135–1146.
- CICCONET, M., GEIGER, D. & WERMAN, M. (2015). Complex-valued hough transforms for circles. In *2015 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, IEEE, pp. 2801–2804.
- COMANICIU, D. & MEER, P. (2002). Mean shift: A robust approach toward feature space analysis. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* **24**, 603–619.
- DAVIES, E.R. (2004). *Machine Vision: Theory, Algorithms, Practicalities*. San Francisco, CA: Morgan Kaufmann Publishers.
- DENIMAL, E., MARIN, A., GUYOT, S., JOURNAUX, L. & MOLIN, P. (2015). Reliable Detection and Smart Deletion of Malassez Counting Chamber Grid in Microscopic White Light Images for Microbiological Applications. *Microsc Microanal* **21**, 886–892.
- KAYTANLI, B. & VALENTINE, M.T. (2013). Evolute-based Hough transform method for characterization of ellipsoids. *J Microsc* **249**, 159–164.
- KIERKEGAARD, P. (1992). A method for detection of circular arcs based on the Hough transform. *Machine Vision and Applications* **5**, 249–263.

- KUMAGAI, S. & HOTTA, K. (2012). Counting and radius estimation of lipid droplet in intracellular images. In *2012 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics (SMC)*, IEEE, pp. 67–71.
- LEHMUSSOLA, A., SELINUMMI, J., RUUSUVUORI, P., NIEMISTO, A. & YLI-HARJA, O. (2006). Simulating fluorescent microscope images of cell populations. In *IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society*, IEEE, pp. 3153–3156.
- LIU, F., HE, B. & BI, B. (2011). Study on algorithms of graphic element recognition for precise vectorization of industrial computed tomographic image. *Global J Res Eng* **11**, 523–528.
- MCGILL, R., TUKEY, J.W. & LARSEN, W.A. (1978). Variations of box plots. *Am Stat* **32**, 12–16.
- OTSU, N. (1975). A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica* **11**, 23–27.
- RAD, A. A., FAEZ, K. & QARAGOZLOU, N. (2003). Fast Circle Detection Using Gradient Pair Vectors. In *Dicta*, pp. 879–888.
- TAO, Z., JUNJIE, G. & ENXIU, S. (2008). An algorithm for fast circular object detection based on discrete evolute distribution. In *ISISE'08 International Symposium on Information Science and Engineering, 2008*. IEEE, Vol. 1, pp. 321–324.
- TIMM, F. & BARTH, E. (2011). Accurate, fast, and robust centre localisation for images of semiconductor components. In *IS&T/SPIE Electronic Imaging*, International Society for Optics and Photonics, pp. 787705–787705–10.

d. Automatic counting of intra-cellular ribonucleo-protein aggregates in *saccharomyces cerevisiae* using a textural approach

Cet article présente la problématique de comptage des agrégats ribo nucléoprotéiques dans le cadre du protocole expérimental de stress thermique.

Nous présentons dans cet article uniquement le premier cas de l'étude, concernant l'estimation du nombre d'agrégats dans un ensemble de cellules préalablement segmentées.

Nous décrivons ici les travaux effectués pour obtenir une estimation de ce nombre en utilisant une approche texturale. Ainsi que les résultats obtenus en terme de classification et une partie de l'étude sur la robustesse de la méthode proposée.

Les résultats complets de l'estimation pour l'ensemble de nos images sont amenés à être inclus dans un prochain article centré sur les problématiques biologiques auxquelles cette estimation doit aider à apporter des réponses.

Original Article

Automatic Counting of Intra-Cellular Ribonucleo-Protein Aggregates in *Saccharomyces cerevisiae* Using a Textural Approach

Ambroise Marin^{1*}, Emmanuel Denimal¹, Lucie Bertheau¹, Stéphane Guyot², Ludovic Journaux^{1,3} and Paul Molin⁴

¹Agrosup, 26 boulevard docteur, petitjean, Dijon, Bourgogne, 21000, France; ²UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, Agrosup Dijon/Université de Bourgogne, 1, esplanade Erasme, Dijon, Bourgogne 21000, France; ³Laboratoire d'Informatique de Bourgogne, EA7534, Université de Bourgogne, UFR Sciences et Techniques, allée Alain Savary, Dijon, Bourgogne, 21000, France and ⁴UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, Agrosup Dijon/Université de Bourgogne, 1, esplanade Erasme, Dijon, Bourgogne, France

Abstract

In the context of microbiology, recent studies show the importance of ribonucleo-protein aggregates (RNPs) for the understanding of mechanisms involved in cell responses to specific environmental conditions. The assembly and disassembly of aggregates is a dynamic process, the characterization of the stage of their evolution can be performed by the evaluation of their number. The aim of this study is to propose a method to automatically determine the count of RNPs. We show that the determination of a precise count is an issue by itself and hence, we propose three textural approaches: a classical point of view using Haralick features, a frequency point of view with generalized Fourier descriptors, and a structural point of view with Zernike moment descriptors (ZMD). These parameters are then used as inputs for a supervised classification in order to determine the most relevant. An experiment using a specific *Saccharomyces cerevisiae* strain presenting a fusion between a protein found in RNPs (PAB1) and the green fluorescent protein was performed to benchmark this approach. The fluorescence was observed with two-photon fluorescence microscopy. Results show that the textural approach, by mixing ZMD with Haralick features, allows for the characterization of the number of RNPs.

Key words: Generalized Fourier descriptors, Haralick, ribonucleo-protein aggregates, sub-cellular structures, Zernike

(Received 20 August 2018; revised 9 November 2018; accepted 14 December 2018)

Introduction

Recent studies (Protter & Parker, 2016) have shown the importance of ribonucleo-protein aggregates (RNPs) for the understanding of inner cell mechanisms. The assembly and disassembly of RNPs is a dynamic and reversible process which can be observed in response to specific environmental conditions such as thermal, oxidative, or osmotic stress (Grousl et al., 2009; Buchan et al., 2010). Understanding the functions of RNPs is an important issue for microbiology and needs for performant and adapted tools to observe and characterize them. The number of RNPs is a marker of the stage of the aggregation process (Protter & Parker, 2016). In this study, we focused on the analysis of microscopic images for the characterization of the number of RNPs, cell by cell within the whole image.

RNPs were observed in a specific modified *Saccharomyces cerevisiae* strain presenting a fusion between a protein found in RNPs (PAB1) and the green fluorescent protein (GFP) that allows for two-photon fluorescence microscopic imagery.

*Author for correspondence: Ambroise Marin, E-mail: ambroise.marin@agrosup-dijon.fr

Cite this article: Marin A, Denimal E, Bertheau L, Guyot S, Journaux L, Molin P (2019) Automatic Counting of Intra-Cellular Ribonucleo-Protein Aggregates in *Saccharomyces cerevisiae* Using a Textural Approach. *Microsc Microanal.* doi:10.1017/S1431927619000084

© Microscopy Society of America 2019

An accurate determination of the number of RNPs appears to be almost impossible: in the example showed in Figure 1, human counts vary from 3 to 12 with an average of 7.6.

In a previous paper (Denimal et al., 2017), we developed methods for cell counting based on accumulation algorithms. Unfortunately, it does not allow for RNPs counting because these objects are defined by a very low number of pixels and do not allow for a sufficient accumulation.

Based on these observations, we did not try to count directly the RNPs, instead, we tried to characterize the whole cell with a feature or a set of features which should be related to the number of RNPs in the cell. Coming to observation, the idea of a textural approach is based on the hypothesis that cells are more “textured” when the number of RNPs increases. The method we propose for counting RNPs is then based on the extraction of textural features from the images in order to feed a supervised classifying method. Textural features were chosen following three approaches: Haralick (Haralick, 1979), features that are usual and represent the reference, generalized Fourier descriptor (GFD) (Smach et al., 2008), which is a frequency approach, and Zernike moment descriptors (Ryu et al., 2013), which give a description based on the structure of the images. We then determined the textural approach that works the best for the estimation of RNPs count. For the supervised classification method, the linear discriminant analysis (LDA) was used, see for example Saporta (2006).

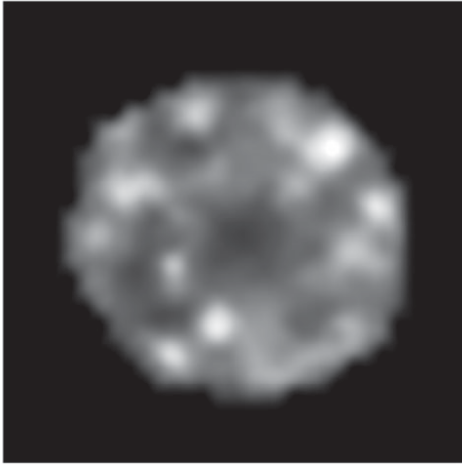


Fig. 1. Example of cells with RNP aggregates.

Materials and Methods

Biological Material and Experiment

Yeast Strain and Plasmid

The insertion mutant strain expressing Pab1p-GFP (BY4742; MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YER165W::GFP) derives from the haploid strain of *S. cerevisiae* BY4742 (MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0). This mutant strain which allowed the expression of Pab1p fused to the GFP was created by homologous recombination using the pKT127 plasmid (Euroscarf, Frankfurt, Germany).

Growth Conditions

YPD medium (1% yeast extract, 2% bacteriological peptone, 2% D-glucose; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used for the growth of the yeast cells. A liquid culture of 100 mL in a 250 mL flask was performed from one colony grown on YPD solidified medium (2% agar) and shaken at 250 rpm for 48 h at 25°C to achieve the stationary phase. The transformed yeasts were selected onto YPD medium plates supplemented by geneticin (G418; 200 μ g/mL, Sigma-Aldrich).

Yeast Transformation

The linear fragment containing the gene coding the GFP and the markers, flanked by 40 bp homologous to yeast genomic DNA integration sites (Table 1), was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the pKT127 plasmid. The preparation and transformation of competent cells of BY4742 strain with this fragment (1 μ g) were carried out according to the lithium acetate method described by Gietz *et al.* (1995).

Thermal Treatments

Once the stationary phase was achieved, 1 mL of yeast culture was centrifuged for 5 min at 2,880 \times g at 25°C. The cell pellet was resuspended in 1 mL of fresh YPD medium, vortex-mixed, and once again centrifuged (5 min, 2,880 \times g, 25°C). After resuspension of cells in 1 mL of fresh YPD, 100 μ L was added into a

0.5 mL PCR microtube. By using a PCR gradient thermal cycler (MJ Research PTC200, MJ Research, Waltham, USA), the sample (100 μ L) was heat treated as previously described in Guyot *et al.* (2015).

Two-Photon Fluorescence Microscopy

Following heat treatments or not (control), the yeast strains expressing Pab1p-GFP were washed twice with PBS. Ten microliters of cell suspensions were observed under a two-photon fluorescence microscope (Nikon A1-MP) equipped with a \times 60 Apo Infrared (IR) objective (NA: 1.27, water immersion, Nikon, Japan) and NIS-Elements C software was used for image acquisition. Excitations at 880 nm were achieved using an IR laser (Chameleon Coherent). Optical short-pass filters (FF03-525/50-25, transmission band >93%, 500–550 nm, center wavelength: 525 nm, Semrock, IDEX Health & Science, LLC, 3625 Buffalo Road, Suite 6, Rochester, New York 14624) were used to collect fluorescence in the green channel (500–550 nm, GFP). Experiments were performed from three independent cultures and 210 images were obtained and used as the sample in this paper.

Image Processing

Cell Segmentation. First, noise was treated using the Kovsi filtering method (Kovesi, 1999) with seven wavelet orientations. This approach preserves the phase of the signal and hence does not alter the edges of objects in the image. It also provides a mechanism for automatic adaptation to the noise level. Next, a multi-level Otsu threshold method (Otsu, 1979) was used to separate cells from the background. This method allows for the detection of cells in images presenting variable levels of diffuse fluorescence. The watershed method (Vincent & Soille, 1991) was then applied in order to separate individual patches. The resulting patches were then filtered using size and eccentricity criteria. According to the microscope magnification and digital camera specifications used in this experiment, it has been stated that only cells with surface larger than 200 pixels allow for relevant features computation, hence, patches with lower size were discarded. Maximum eccentricity was set to 0.7 to discard degenerated cases. This segmentation algorithm allowed us to select 4,999 individual yeast thumbnails (31 \times 31 pixels) within the 210 images of the sample.

Generalized Fourier Descriptors. The GFDs are well known to be relevant in the study of thumbnails and their classification (Smach *et al.*, 2008).

The Fourier transform, \hat{f} , is defined by the following equation:

$$\hat{f}(\xi) = \int_{\mathbb{R}^2} f(x)e^{-i(x|\xi)} dx$$

where f is an integrable function on the plane and $\langle \cdot, \cdot \rangle$ is the scalar product on \mathbb{R}^2 .

GFDs, D_f , are defined by the following equation:

$$D_f(\lambda) = \int_0^{2\pi} |\hat{f}(\lambda, \theta)|^2 d\theta$$

where $\hat{f}(\lambda, \theta)$ is the Fourier transform of a point ξ whose polar coordinates are (λ, θ) .

GFDs are then built by summation of the two-dimensional (2D) fast Fourier transform along the circles of radius λ .

Table 1. Primers.

Primers	Description	Source or Reference
RH-Pab1-GFP-F	GTCTTTCAAAAAGGAGCAAGAACAACAACTGAGCAAGCTGGTGACGGTCTGGTTTA	This study
RH-Pab1-GFP-R	TAAGTTTGTGAGTAGGGAAGTAGTGATTACATAGAGCATCGATGAATTCGAGCTCG	

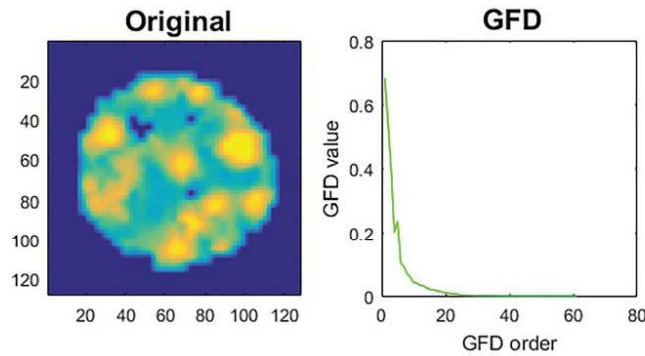


Fig. 2. GFD computation. Left: Original image, right: plot of GFD values for each order.

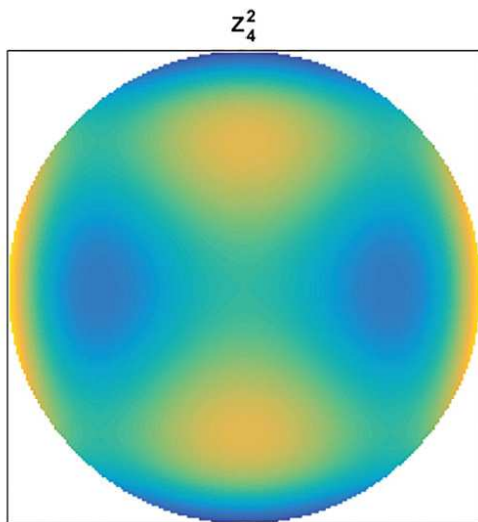


Fig. 3. $V_{4,2}$ Zernike function.

Note that a property of GFDs is that they are invariant by image rotation, hence, two similar cells with different orientations should give similar GFDs.

For digital imaging, the 2D Fourier transform is defined by the following equation:

$$\text{FFT}(k_x, k_y) = \frac{1}{\sqrt{N_x N_y}} \sum_{n_x=0}^{N_x-1} \sum_{n_y=0}^{N_y-1} f(n_x, n_y) e^{-2i\pi \frac{k_x n_x}{N_x}} e^{-2i\pi \frac{k_y n_y}{N_y}}$$

where (k_x, k_y) are the coordinate indices of the transformed image, (n_x, n_y) are the coordinate indices of the source image and (N_x, N_y) , its size.

GFDs are then computed by summation along discretized circles. The method used for this discretization ensures that pixels of circles with different radii do not overlap and no pixel is ignored. Figure 2 shows an example of GFDs plot.

Zernike moments

Zernike moments (Ryu et al., 2013) of order n with repetition m , $A_{n,m}$, are defined by the following equation:

$$A_{n,m} = \frac{1+n}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^1 f(\rho, \theta) V_{n,m}^*(\rho, \theta) \rho d\rho d\theta$$

where (ρ, θ) are the polar coordinates over the unit disk, $f(\rho, \theta)$ is the original image, $V_{n,m}$ are the Zernike functions, n being a positive integer and m , an integer such that $n - |m|$ is positive and even (the symbol * means the complex conjugate):

$$V_{n,m}(\rho, \theta) = R_{n,m}(\rho) e^{im\theta}$$

where $R_{n,m}(\rho)$ are the Zernike polynomials given by:

$$R_{n,m}(\rho) = \sum_{k=0}^{(n-|m|)/2} \frac{(-1)^k [(n-k)!] \rho^{n-2k}}{k! ((n+|m|)/2 - k)! ((n-|m|)/2 - k)!}$$

Zernike functions $V_{n,m}$ are orthogonal and can be used as a basis of functions on the unit disk. The Zernike moments were originally developed as a tool for characterization of optical lens defects (mainly for $n \leq 4$) like astigmatism ($V_{2,2}$), comatic aberration ($V_{3,1}$), or defocus ($V_{2,0}$). Nevertheless, a look at higher degrees shows that finer intracellular structures can be described by these functions (see e.g., $V_{4,2}$ in Fig. 3). In fact, any function on the disk can be decomposed on the basis of its characterization.

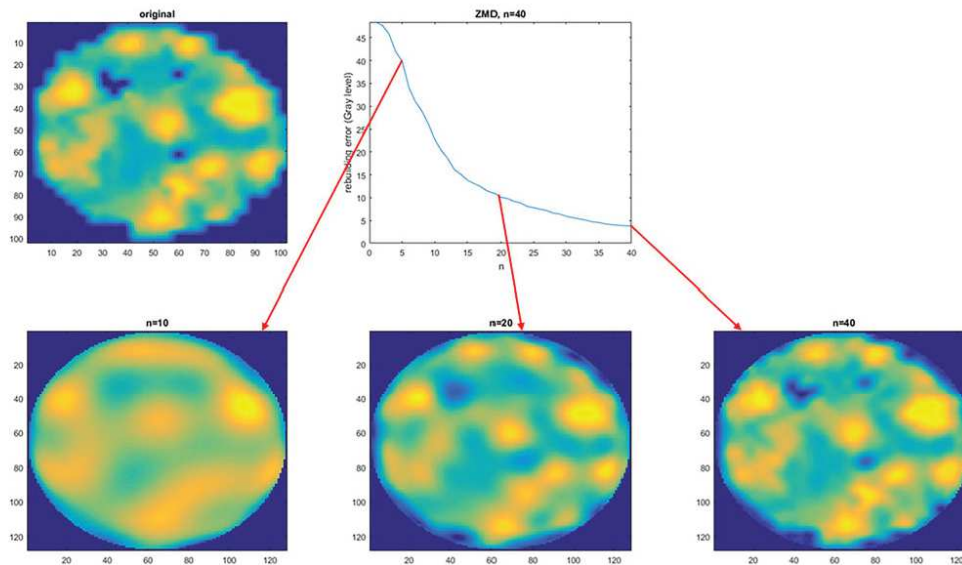


Fig. 4. Zernike moments, from top left to bottom right: Original image, residual error (gray level standard deviation) after rebuilding for $n = 1$ to 40, rebuilt image for $n = 10$, $n = 20$, and $n = 40$.

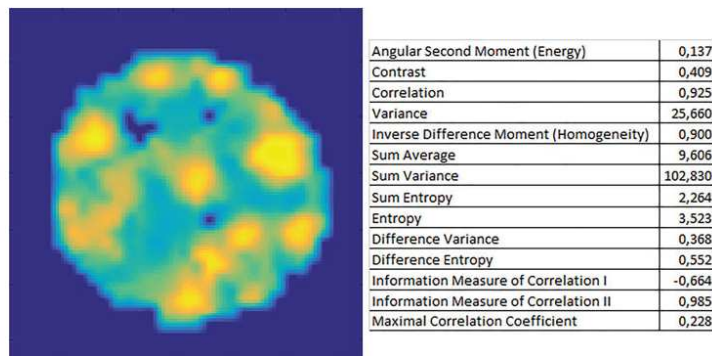


Fig. 5. Haralick features, original image (left), table of 14 Haralick feature values.

These functions play, for functions on the unit disk, the role of the e^{int} for the computation of Fourier coefficients of a periodic function. Bessel inequality and Parseval identity remain true.

A noticeable property is that $|A_{n,m}|$ are invariant by rotation. We then used $|A_{n,m}|$ instead of $A_{n,m}$ as inputs for the LDA, in order to prevent problems of image orientation.

Zernike functions can be scaled in order to adapt them to the size of the studied image.

Figure 4 shows a rebuilt image with different values for n (10, 20, and 40). Rebuilding the residual error curve shows a slope break for $n = 15$. That means that the rebuilt quality improves slower when n becomes greater than 15, hence, for this study, n was then fixed to 15 for Zernike moment computation, which actually results in 72 coefficients $A_{n,m}$.

Another issue is that the 4,999 cells have different sizes and shapes and are segmented within fixed size square thumbnails. That means that each cell occupies a variable part of the square image while the remaining is constituted by only black pixels. It is desired that the Zernike moments describe the inner cell and not the variability of the thickness of the black rim around it. This issue is solved by using cells minor axis length as scale factor so that the unit circle fits the inner cell.

Haralick Textural Features. Haralick textural features (Haralick, 1979) are the most usual features for textural description (see e.g., Fleet *et al.*, 2014). A feature consists of a set of 14 algebraic quantities (Fig. 5) computed from the gray level co-occurrence matrix (GLCM).

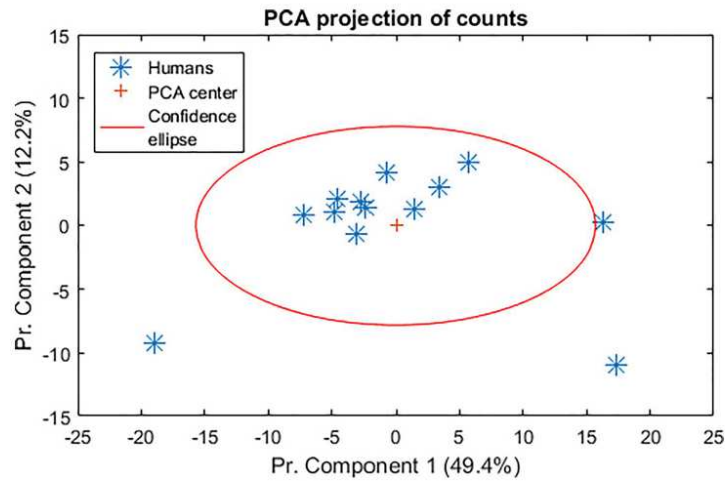


Fig. 6. PCA projection of human counts and 90% confidence ellipse.

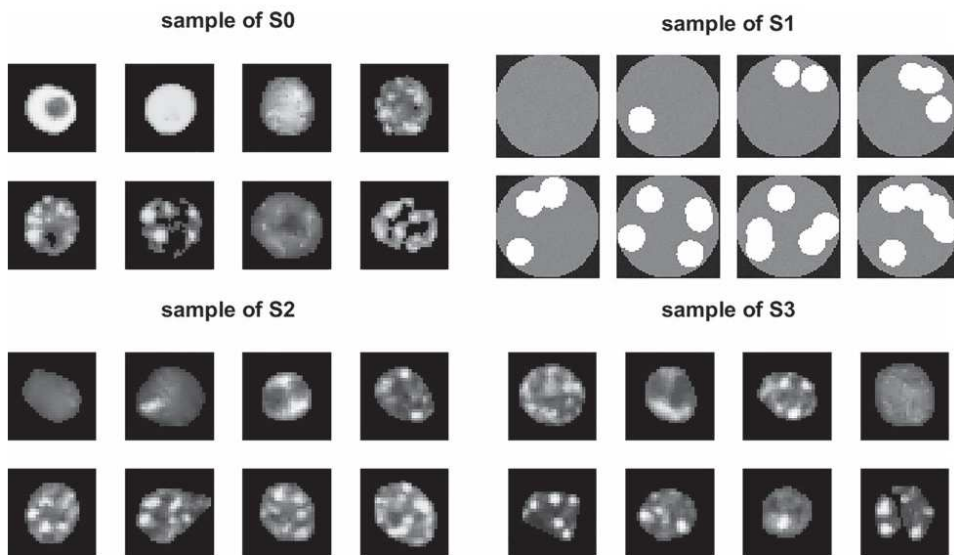


Fig. 7. Samples of S0, S1, S2, and S3.

GLCM is defined over the image and describes the distribution of co-occurring pixel values for a given offset. In this study, an offset of [0 1] is used, it means that co-occurring pixel values are “one pixel right” in the image. GLCM is then built using the following equation:

$$GLCM(i, j) = \sum_{x=1}^n \sum_{y=1}^m \begin{cases} 1 & \text{if } I(x, y) = i \text{ and } I(x + 1, y) = j \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

where I is the source image, i, j are the pixel values, and x, y are the coordinates in the image.

Note that GLCM is a square matrix and its dimension is the number of values for a pixel. With images coded on 8 bits, it would give a 256×256 matrix. In this study, with 31×31 thumbnails, it would result in a very sparse matrix which does not allow for Haralick feature computation, hence, the source image is mapped on 3 bits in order to reduce the dimension of GLCM to 8×8 .

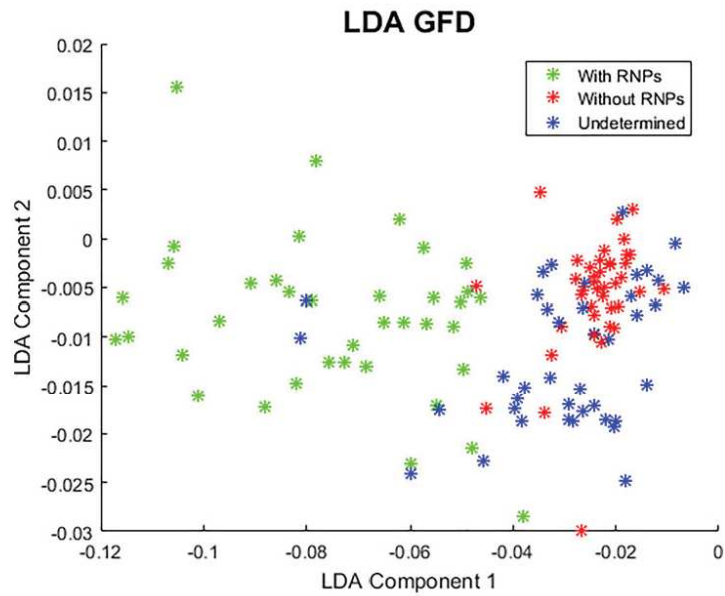


Fig. 8. LDA of GFD computed on S_0 .

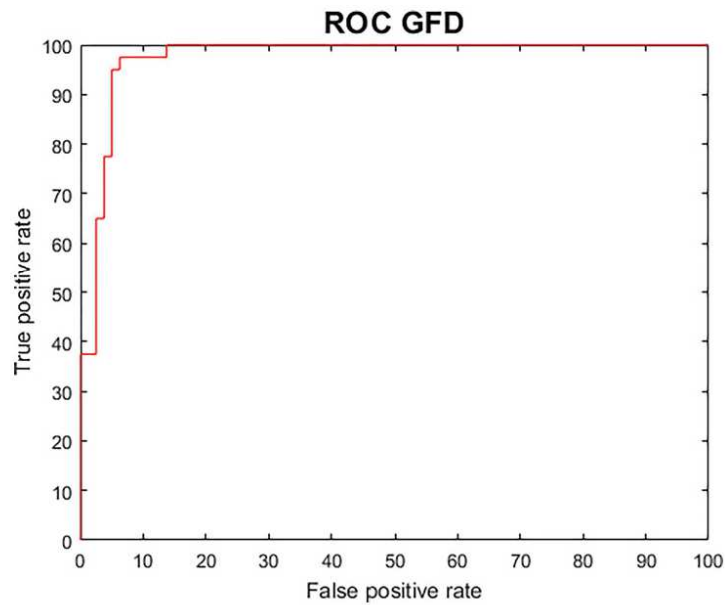


Fig. 9. GFD ROC curve, green points in LDA projection are considered as positive.

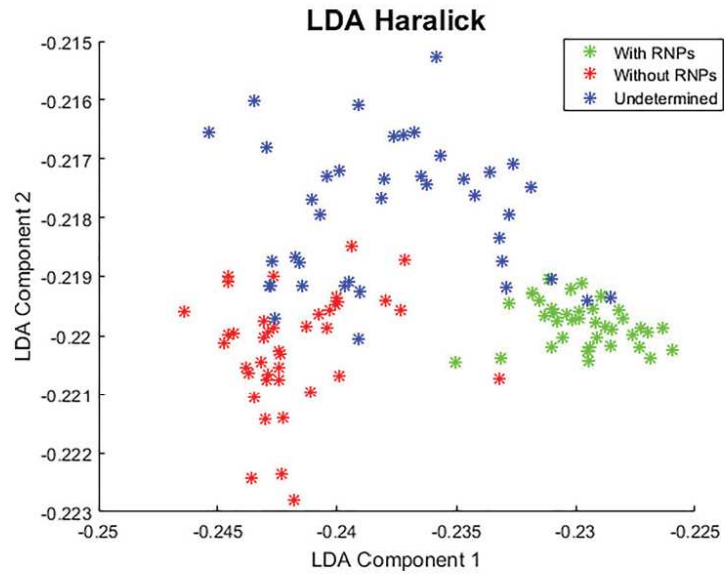


Fig. 10. LDA of Haralick features computed on S0.

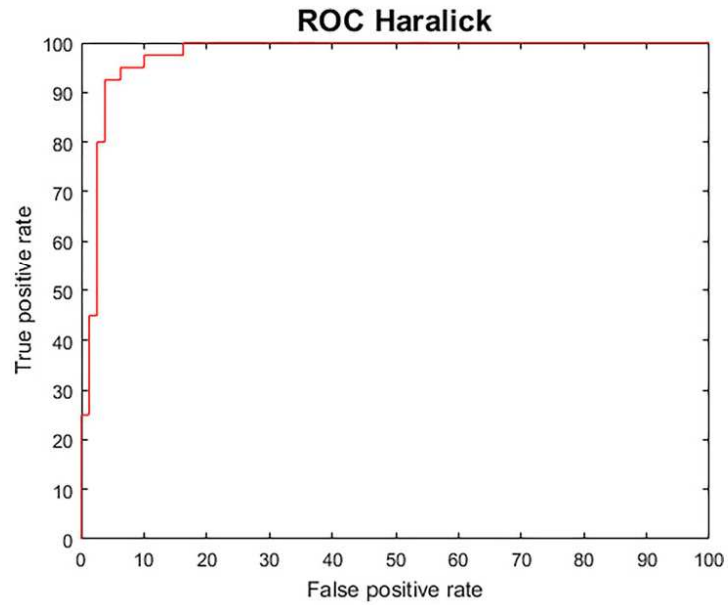


Fig. 11. Haralick features ROC curve, green points in LDA projection are considered as positive.

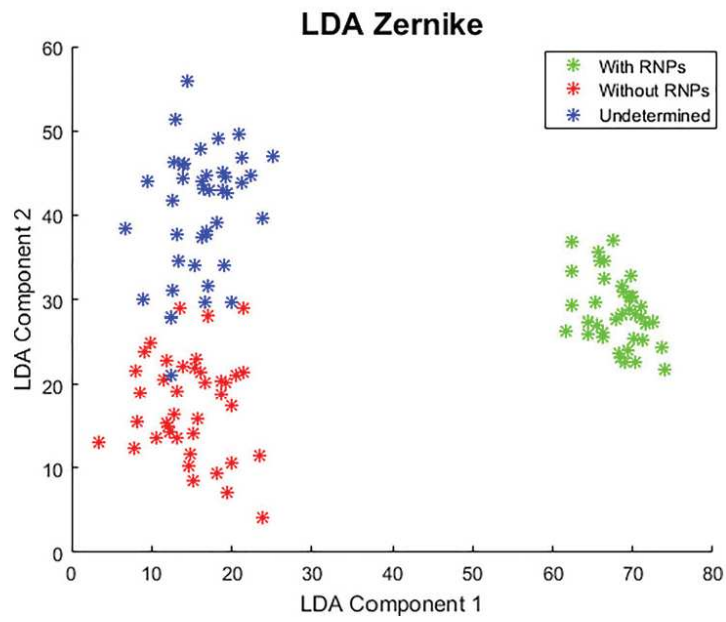


Fig. 12. LDA of Zernike moments computed on S_0 .

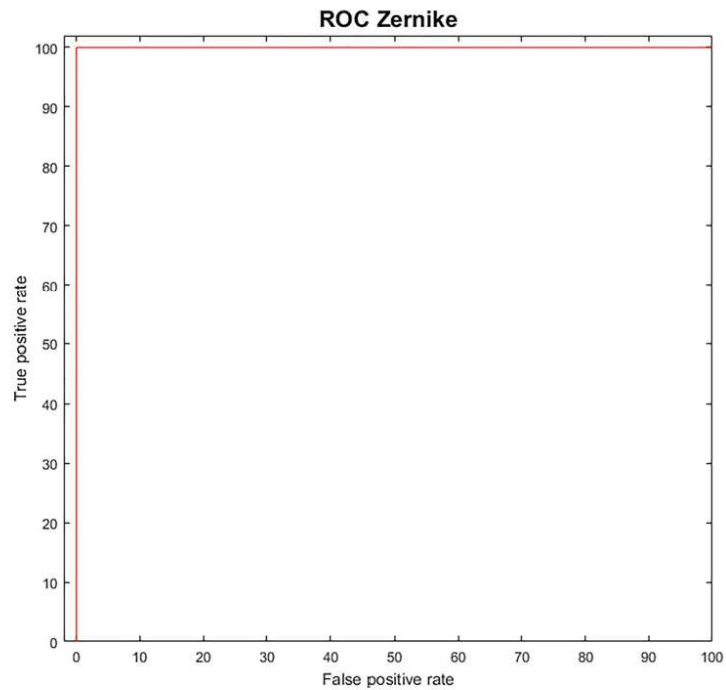


Fig. 13. Zernike moments ROC curve, green points in LDA projection are considered as positive.

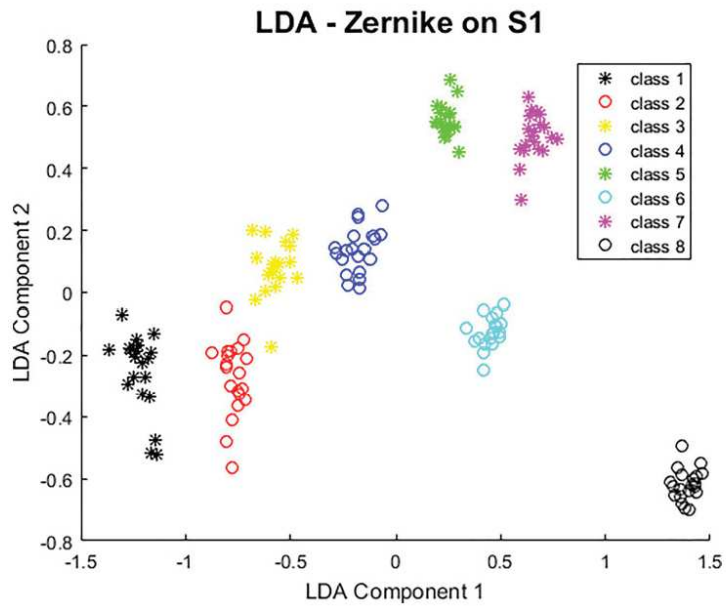


Fig. 14. LDA projection, Zernike moments on set S1.

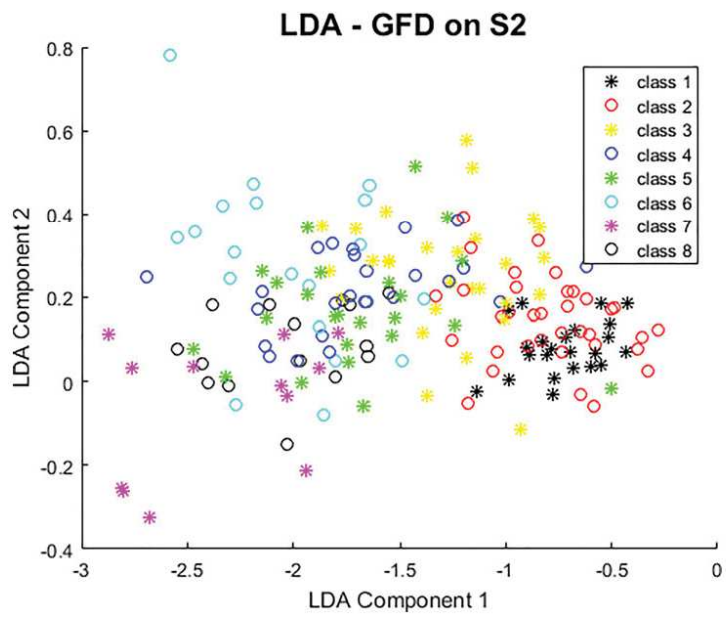


Fig. 15. LDA projection, GFD on set S2.

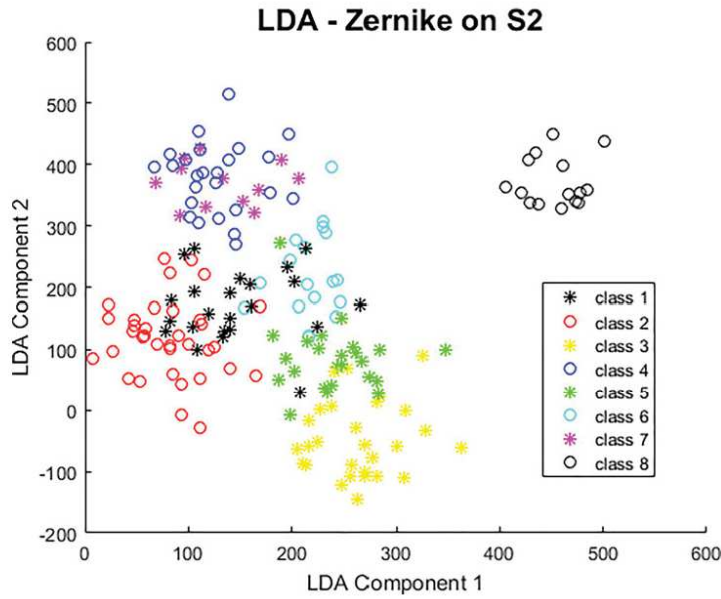


Fig. 16. LDA projection, Zernike moments on set S2.

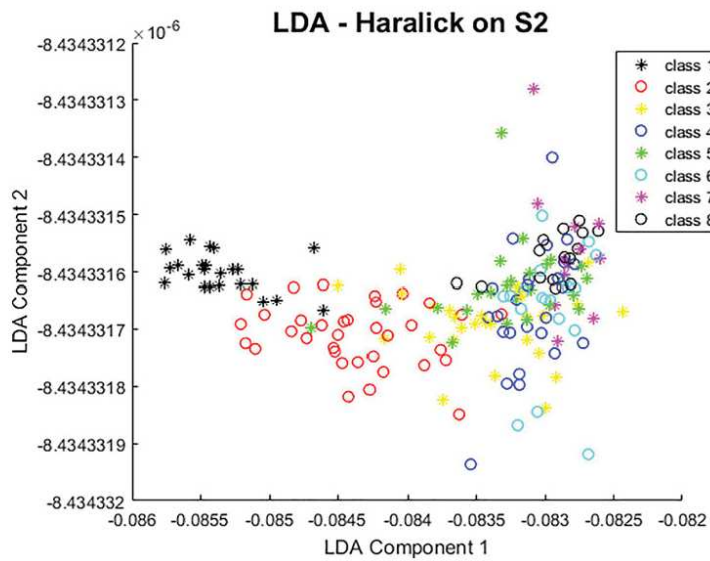


Fig. 17. LDA projection, Haralick features on set S2.

As for the Zernike moment, the issue of black pixels arises and must be taken into account; if it is not, GLCM may include a preponderant part of "0-0" entries and it may generate a shift in feature computation. As it is required to describe inner cell texture and not only its size, which is directly correlated with the size

of the black zone, this issue is treated by replication of inner cell pixels on the whole square.

In the context of this study, a high correlation is observed between the three measures related to image variance (variance, sum variance, and difference variance). Therefore, in a further

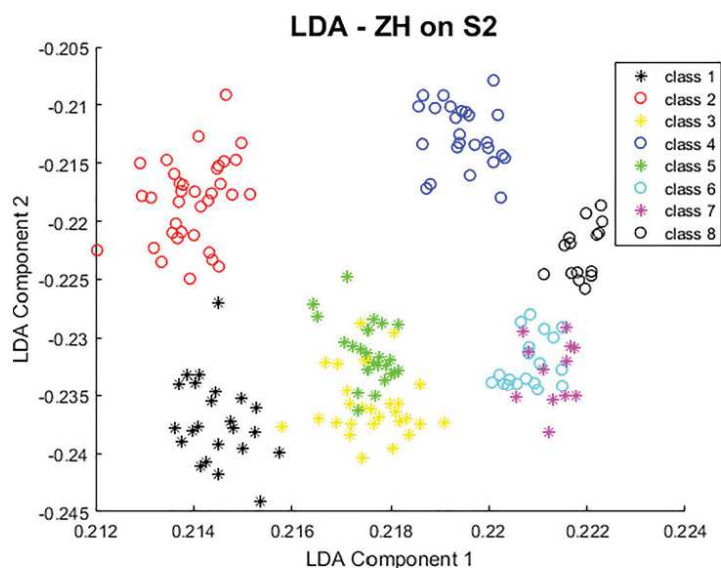


Fig. 18. LDA projection, Haralick features merged with Zernike moments on set S2.

optimization, it should be better to reduce the Haralick feature vectors by removing the redundant features.

Classification. Classification is a central problem of pattern recognition (Duda et al., 2001) and many approaches to solve it have been proposed, the connectionist approach (Bishop, 1995), metrics based methods, nearest neighbors (Cunningham & Delany, 2007), LDA (McLachlan, 2004), decision tree (Quinlan, 1986), and kernel-based methods such as support vector machines (Vapnik, 1998), are probably the most common. All these methods rely on a training set established with a clear ground truth. Considering the problematic of the evaluation of an inner cell RNPs number, as shown in the principal component analysis (PCA) results (Fig. 6), the determination of this ground truth is a problem. In most cases, experts are not able to determine the number of RNPs precisely. Common supervised classifiers were tested with a similar performance. This study does not focus on the determination of the best classifier, so a standard LDA, accurate enough with respect to the ground truth, was chosen (see e.g., Saporta, 2006).

Training and Validation Sets

Four sets of thumbnails, respectively called S0, S1, S2, and S3, are used in this study.

S0 is comprised of 120 cells divided into three classes, respectively: 40 with RNPs, 40 without RNPs, and 40 where RNPs presence is ambiguous. This set is used to benchmark the capacity of textural parameters to detect the presence of RNPs (Fig. 7, top left).

S1 is a set of synthetic cells was generated in order to benchmark the count estimation approach. The design used is very simple and consists of n white disks simulating RNPs, included randomly in a gray disk representing the cell and then perturbed

with Gaussian noise. This set consists of 160 cells: 20 cells for each integer n from 0 to 7 (Fig. 7, top right).

S2 is set as a ground truth for the classification method. It consists of a selection of 181 out of 4,999 cells with no ambiguous counts of RNPs. Eight classes have been determined for cells with 0 to 6 RNPs and a class for cells with 7 or more (Fig. 7, bottom right). S2 will be used as the training set for the LDA.

S3 is comprised of 240 cell thumbnails, which have been selected randomly in order to validate the results (Fig. 7, bottom right). For this set, 13 volunteers (ten biologists and three non-biologists) counted number of RNPs for each cell. A PCA has been performed on these counts (Fig. 6). Each point of the PCA projection represents a human counter. The spreading of points and the outliers (out from 90% confidence ellipse) show the difficulty in obtaining consensual results. For example, in an extreme case, human counts vary from 3 to 12 RNPs for the same cell. This set is used to compare the results of automated methods to human counts.

Results

Automatic Detection of RNPs

The three textural parameter sets (GFD, Haralick, and Zernike) have been computed on set S0 and then, LDA was performed in order to obtain a projection on its axis. Green markers represent cells where there is no doubt about the presence of RNPs, red markers represent cells where there are no RNPs, and blue markers are ambiguous cases.

GFD

The LDA projection (Fig. 8) suggests that GFDs can be used to roughly identify cells with RNPs but fails at separating the two other classes.

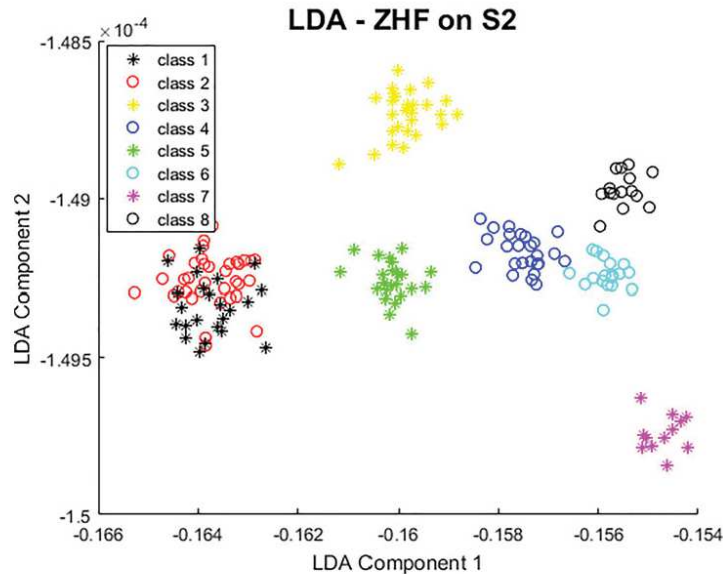


Fig. 19. LDA projection, Haralick features merged with Zernike moments and GFDs on set S2.

Table 2. Comparison of Results with Zernike Moments, Haralick Features, Zernike Moments Merged with Haralick Features (ZH), and Zernike Moments Merged with Haralick Features and Generalized Fourier Descriptors (ZHF).

	Zernike	Haralick	ZH	ZHF
Error S2 versus S2	5	73	1	0
Error S3 versus S3	55	81	44	37
Bias	5.3	3.5	1.4	2.1

Considering cells with RNPs (green points) as the positive class and the others as the negative one, the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve obtained (Fig. 9) with an LDA classification suggests that GFDs can perform quite well for the detection of the presence of RNPs.

Haralick

LDA projection (Fig. 10) shows that Haralick features should allow for a more precise cluster separation for the three classes than the GFDs.

Considering cells with RNPs (green points) as the positive class and others as the negative one, the ROC curve obtained (Fig. 11) with an LDA classification shows that Haralick descriptors' performance for RNPs detection is equivalent to the GFDs.

Zernike

LDA projection (Fig. 12) demonstrates that Zernike moments are suitable for a more precise analysis while it forms two identifiable clusters for red and blue markers.

For Zernike moments, the ROC curve (Fig. 13) indicates a 100% classification rate when cells with RNPs (green points) are considered as the positive class.

These results suggest that Zernike moments are the best suited out of these three methods for the detection of RNPs.

Automatic Counting

For the problematic of RNPs counting, the determination of a clear ground truth is a major issue. In order to benchmark the textural approach for RNPs count estimation, a first LDA was computed with Zernike moments computed on set S1 (Fig. 14). LDA projection shows that cell group by the number of synthetic RNPs. This benchmark indicates the possibility of RNPs count estimation by using Zernike moments for counting.

The next step was to evaluate textural approaches on real images.

The LDA was performed on GFDs computed from the set S2 (Fig. 15). This projection shows confusion between classes and tends to indicate that GFDs are not suitable for a characterization of the number of aggregates within the cells.

The LDA was performed on Zernike moments computed for the set S2 (Fig. 16). Compared to projection with synthetic data, it shows more confusion between classes. Cells with 7+ RNPs (class 8) remain clearly separated from others but, although some trends are observable, it is difficult to determine clear clusters for other cells. One major issue appears: the cells with 0 RNPs (class 1) spread widely, which indicates that the Zernike moment failed at identifying real cells with no RNP aggregates.

LDA was then performed on Haralick features computed for set S2 (Fig. 17). This projection shows that cells with low number of RNPs are identified with a good precision while cells with high number of RNPs seem to mix up in the same area of the projection and hence, are not identifiable using Haralick features.

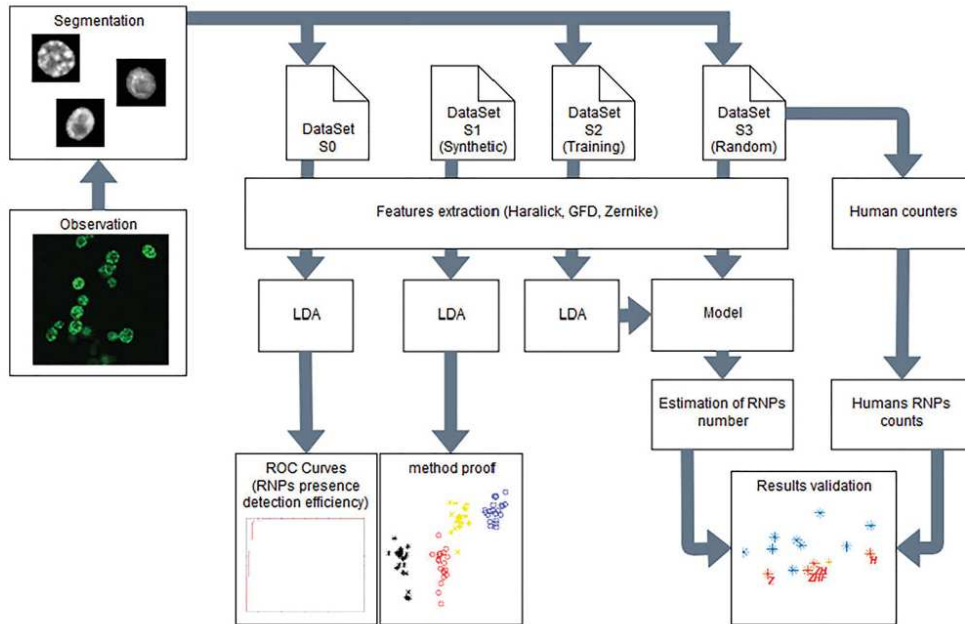


Fig. 20. Dataflow.

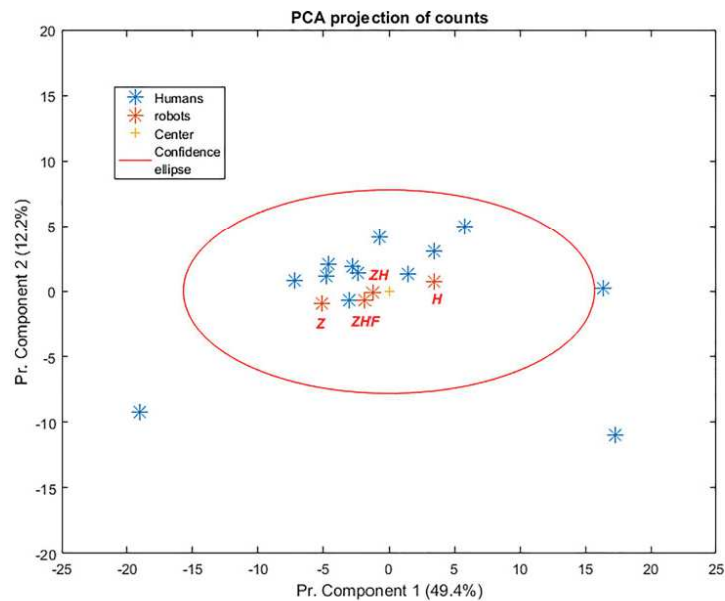


Fig. 21. PCA projection of Zernike moments (Z), Haralick (H), Zernike moments merged with Haralick features (ZH), Zernike moments merged with Haralick features, and with GFDs (ZHF), and human counts. In red, 90% confidence ellipse.

Downloaded from <https://www.cambridge.org/core>. University of New England, on 13 Feb 2019 at 13:30:24, subject to the Cambridge Core terms of use, available at <https://www.cambridge.org/core/terms>. <https://doi.org/10.1017/S1431927619000084>

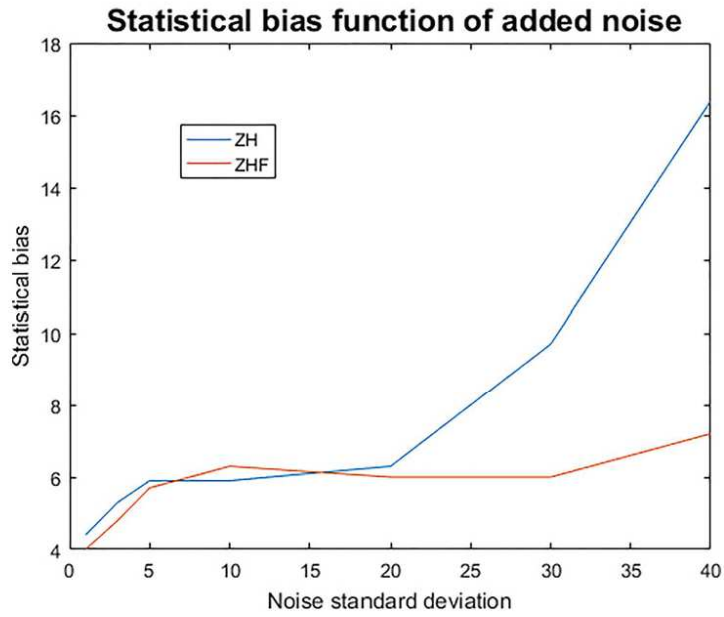


Fig. 22. Statistical bias for ZH and ZHF in function of noise standard deviation.

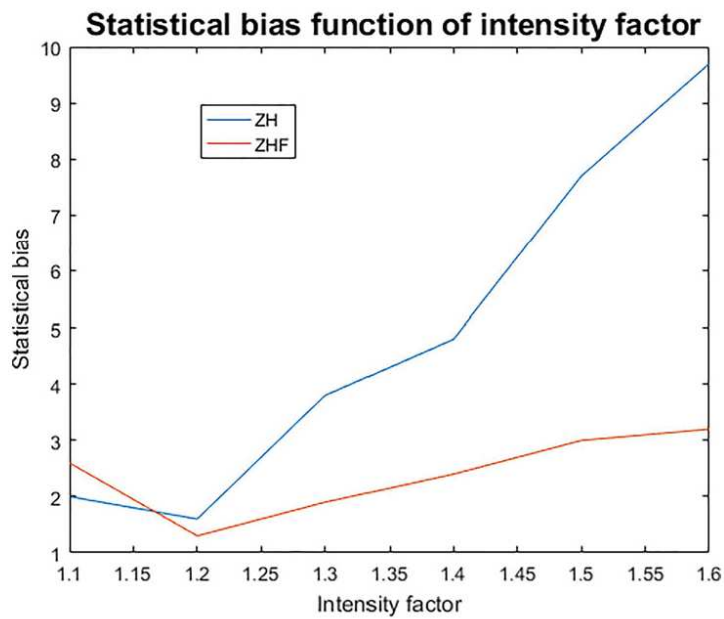


Fig. 23. Statistical bias for ZH and ZHF in function of intensity factor.

Table 3. Percentage of Good Classification for ZH and ZHF in Function of Noise Standard Deviation.

Noise std	0 (%)	1 (%)	3 (%)	5 (%)	10 (%)	20 (%)	30 (%)	40 (%)
ZH	82	69	68	70	55	66	63	54
ZHF	85	72	70	72	70	71	69	64

Table 4. Percentage of Good Classification for ZH and ZHF in Function of Intensity Factor.

Intensity Factor	1 (%)	1.1 (%)	1.2 (%)	1.3 (%)	1.4 (%)	1.5 (%)	1.6 (%)
ZH	82	79	75	75	73	66	63
ZHF	85	84	80	78	77	75	73

From these two last projections, it seems that the automation of counting using the textural approach must use the advantages of both Zernike moments and Haralick features.

For this aim, Haralick features were merged with Zernike moments in a unique array and an LDA was performed (Fig. 18). It results in a good separation of low and high number of RNPs classes although there remains some confusion in middle number classes.

Despite the fact that GFDs alone seem unable to clearly separate classes, in the LDA projection (Fig. 15), classes seem to spread following a gradient, thereby GFDs seem to show some interesting information. Hence, the three chosen textural parameters were merged in order to deal with the confusion in intermediate classes observable with ZH.

An LDA was then performed (Fig. 19) and it shows a good separation of all classes. Classes 1 and 2 seem to mix up as shown in Figure 19, although it is due to the fact that only the first two axes of LDA are represented for visibility issue. These classes are clearly separated on the third axis.

Final Counting Estimation

In order to benchmark the approach for estimation of RNPs counts, an LDA was performed with Zernike moments computed on the synthetic set of cells S1. The LDA projection shows that cells clearly group by the number of RNPs (Fig. 14). This result suggests that Zernike moments contain sufficient and relevant information for the number of RNPs. This benchmark validates the possibility of an accurate RNPs count estimation using Zernike moments descriptors. The next step is to evaluate approaches on real images.

The LDA was performed on GFDs computed for the 181 cells of the training set S2 (Fig. 15). Results show that the GFDs do not allow for a classification, hence, GFDs were discarded for this study.

The LDA was then performed on Zernike moments computed for the 181 cells of the training dataset S2 (Fig. 16). Compared to projection with synthetic data S1, there is some little confusion evident between classes. Cells with 0 RNPs spread widely, which indicates that Zernike moments have less accuracy in identification of real cells with low numbers of RNPs.

An LDA was then performed on Haralick features computed for the 181 cells of the training dataset S2 (Fig. 17). This projection shows that cells with low number of RNPs are identified with a good precision, while cells with high number of RNPs seem to mix up in the same area of the projection and hence, are not identifiable using Haralick features.

From these two last projections, it seems that the counting automation using this approach should take advantage of the

complementarity of the Zernike moments and Haralick features in the discrimination of low and high number of RNPs. For this approach, the Haralick feature vector was merged with the Zernike moment vector and an LDA was performed (Fig. 18). This results in a good separation of low and high number of RNPs classes. There remains some confusion in the middle number classes. Moreover, the statistical bias of the mixed method (ZH) is significantly reduced (Table 2).

Finally, GFD was merged with ZH aiming at reducing confusion in middle number of RNPs classes and an LDA was performed (Fig. 19). It results in a better separation of classes considering training set S2. Note that the statistical bias of this method (ZHF) slightly increases compared to ZH (Table 2).

Figure 20 represents the whole dataflow of the proposed method.

Discussion: Algorithm versus Human Counts

It has been determined that the best method for the estimation of the number of RNPs within cells is the ZHF method that merges the three textural approaches, nevertheless, the method that only merges Haralick features with Zernike moments giving good results. These methods were applied on the 240 cell thumbnails of set S3 that have been subjected to humans. For each of these 240 images, we have compared the ZH and ZHF results to the human counting mean (\bar{S}_3) and it lies in their confidence interval of 82 and 85% respectively. A PCA projection (Fig. 21) was then performed on results and shows that ZH and ZHF lie in the middle of human counts. We defined the statistical bias of the automatic counts as the Euclidean distance between the automatic count and the vector of averages of human counts. The PCA being centered, this vector is the null vector. So, one can see a projection of this distance on the graph of the first two axes of the PCA (Fig. 21) as the distance of the projected points (H, Z, ZH, ZHF) to the point of coordinates (0,0). It can be seen that the ZH and ZHF methods reduce significantly the statistical bias (see Table 2) with respect to Zernike moments (Z) and Haralick feature (H) methods. The statistical bias is lower with ZH than with ZHF. The observation of images indicates that first axis can be interpreted as "how the counter over or under evaluates the number of RNPs" and the second seems to be related to the complexity of images.

Robustness

The robustness of the classification model is benchmarked by adding noise and varying gray level intensity of thumbnails of

set S3. Noise is added with seven standard deviations (1, 3, 5, 10, 20, 30, and 40) and intensity is increased using six multiplying factors (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, and 1.6).

Figures 22 and 23 represent the statistical bias for ZH and ZHF as a function of the standard deviation of noise and the multiplying factor for intensity, respectively.

Tables 3 and 4 show the percentage of good classifications for ZH and ZHF as a function of the standard deviation of noise and the multiplying factor for intensity, respectively.

Both ZH and ZHF models are noise sensitive but the ZHF is more robust and maintains a classification rate superior or equal to 70% with most noise levels. In addition, the statistical bias increases less with ZHF than with ZH indicating that, for a given noise, the classification error is lower with ZHF than with ZH. In other words, for a given noise level, the RNPs count estimation with ZHF is closer to the ground truth than with ZH.

The ZHF model includes GFDs which are based on a Fourier transform. Since noise is a high frequency phenomenon and considering that, by construction, the GFD gives more importance to low frequency, it explains why the ZHF model provides a better robustness to noise than the ZH model.

Concerning the gray level intensity, the ZH model is more sensitive than the ZHF model, especially with intensity factors exceeding 1.4. Moreover, similarly to that happens with noise level variation, statistical bias does not increase as much with the ZHF than with the ZH model and indicates that, for a given intensity factor, the RNPs count estimation is also closer to ground truth. Theoretically, GFDs are not sensitive to intensity variations, therefore, the addition of GFDs to the ZH model explains the better robustness of ZHF to intensity variations.

Conclusion

In this study, we have shown the possibility of estimating the number of RNPs in cells by the usage of a textural approach. It has been determined that the results can be greatly improved by merging Haralick features with Zernike moments (ZH model) and that the robustness of this approach can be improved by merging also GFDs (ZHF model).

The results have been validated by a comparison with human countings. This approach allows for quick and repeatable countings of RNPs for all cells in a microscopic image and allows for a statistical characterization of RNPs assembly dynamic. In a further work, we plan to use two different fluorescent markers in order to allow for the estimation of the number of P-Bodies and stress granules separately. Using deep learning is also something that we envisage exploring. It will be allowed by the enrichment of the thumbnails database, which is currently too limited with only 5,000 individual cells.

Acknowledgments. This work was supported by the Regional Council of Bourgogne-Franche Comté and the "Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)". Lucie Bertheau was funded by the Regional Council of Bourgogne-Franche Comté and the "Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)". Calculations were performed using HPC resources from DNUM CCUB (Centre de Calcul de l'Université de Bourgogne) using

Matlab® on their mainframes. The authors wish to thank the "Plateau Technique d'Imagerie Spectroscopique (PIMS)" which is a part of "DimaCell platform" (Université de Bourgogne-INRA, Dijon, France).

References

- Bishop CM (1995). *Neural Networks for Pattern Recognition*. Oxford: Oxford University Press.
- Buchan JR, Yoon J-H & Parker R (2010). Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **15**, 228–39.
- Cunningham P & Delany SJ (2007). *k*-Nearest neighbour classifiers. *Mult Classifier Syst* **34**, 1–17.
- Denimal E, Marin A, Guyot S, Journaux L & Molin P (2017). Automatic biological cell counting using a modified gradient Hough transform. *Microsc Microanal* **23**, 11–21.
- Duda RO, Hart PE & Stork DG (2001). *Pattern Classification*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Fleet BD, Yan J, Knoester DB, Yao M, Deller JR & Goodman ED (2014). Breast cancer detection using Haralick features of images reconstructed from ultra wideband microwave scans. In *Workshop on Clinical Image-Based Procedures*, pp. 9–16. Springer.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR & Woods RA (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355–360.
- Grošl T, Ivanov P, Frydlová I, Vašicová P, Janda F, Vojtová J, Malinská K, Malcová I, Nováková L, Janošková D, Valásek I & Hašek J (2009). Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **122**, 2078–2088.
- Guyot S, Gervais P, Young M, Winckler P, Dumont J & Davey HM (2015). Surviving the heat: Heterogeneity of response in *Saccharomyces cerevisiae* provides insight into thermal damage to the membrane. *Environ Microbiol* **17**, 2982–2992.
- Haralick RM (1979). Statistical and structural approaches to texture. *Proc IEEE* **67**, 786–804.
- Kovesi P (1999). Phase preserving denoising of images. In *Proceedings of the 5th International/National Biennial Conference on Digital Image Computing, Techniques and Applications, The Australian Pattern Recognition Society Conference*, pp. 212–217. Perth, Australia.
- McLachlan G (2004). *Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition*. New York: John Wiley & Sons.
- Otsu N (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern B Cybern* **9**, 62–66.
- Protter DS & Parker R (2016). Principles and properties of stress granules. *Trends Cell Biol* **26**, 668–679.
- Quinlan JR (1986). Induction of decision trees. *Mach Learn* **1**, 81–106.
- Ryu S-J, Kirchner M, Lee M-J & Lee H-K (2013). Rotation invariant localization of duplicated image regions based on Zernike moments. *IEEE Trans Inf Forensics Secur* **8**, 1355–1370.
- Saporta G. (2006). *Probabilités, analyse des données et statistique*. Paris: Editions Technip.
- Smach F, Lemaitre C, Gauthier J-P, Miteran J & Atri M (2008). Generalized Fourier descriptors with applications to objects recognition in SVM context. *J Math Imaging Vis* **30**, 43–71.
- Vapnik V (1998). *Statistical Learning Theory*. New York: Wiley.
- Vincent L & Soille P (1991). Watersheds in digital spaces: An efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* **13**, 583–598.

Titre : Méthodes robustes en traitement d'image pour la détection et la caractérisation d'objets compacts. Application à la biologie.

Mots clés : analyse d'image, microscopie, transformée de Hough

Résumé : Dans le domaine de la microbiologie, de nombreuses expériences se basent sur une fine observation des micro-organismes. De par leur intérêt dans le développement de procédés agroalimentaires modernes, il est important d'étudier leur développement et leur taux de survie dans des conditions environnementales spécifiques telles que des stress osmotiques ou thermiques. L'imagerie microscopique est un des outils les plus utilisés pour observer les micro-organismes. L'interprétation manuelle des images acquises pose des problèmes de subjectivité, de coût et reproductibilité. Cette thèse propose le développement d'outils d'analyse d'image standardisés permettant l'interprétation des images à deux échelles :

- A l'échelle de la lame d'observations : l'utilisation de lames de comptage spécifiques (Malassez) permet, à partir du comptage des cellules présente dans la zone d'intérêt de la lame, de déduire la concentration cellulaire d'une solution de *Saccharomyces cerevisiae* soumises à un stress osmotique. Les outils développés permettent l'identification et la caractérisation de cette zone d'intérêt (grille) puis le comptage précis des cellules.
- A l'échelle de la cellule : une souche mutante de *Saccharomyces cerevisiae* permet d'observer en fluorescence la protéine Pab1p-GFP impliquée dans la formation d'agrégats ribonucléoprotéiques intracellulaires consécutifs à un stress thermique. Les outils développés permettent d'obtenir une vue statistique du développement de ces agrégats grâce à l'automatisation de l'estimation de leur nombre pour un très grand nombre de cellules.

Title : Robust methods in image analysis for the detection and the characterisation of compact objects. Application to biology.

Keywords : Image Analysis, microscopy, Hough transform

Abstract : In the field of microbiology, many experiments are based on a fine observation of microorganisms. Because of their interest in the development of modern agri-food processes, it is important to study their development and survival rate under specific environmental conditions such as osmotic or thermal stress. Microscopic imaging is one of the most used tools for observing microorganisms. The manual interpretation of acquired images raises problems of subjectivity, cost and reproducibility. This thesis proposes the development of standardized image analysis tools allowing the interpretation of images at two scales:

- At the scale of the observation slide: the use of specific counting slides (Malassez) allows, from the counting of the cells present in the zone of interest of the slide, to deduce the cell concentration of a solution of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to osmotic stress. The tools developed allow for the identification and characterization of this area of interest (grid) and precise counting of the cells.
- At the cell scale: a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* allows for the observation in fluorescence the Pab1p-GFP protein involved in the formation of intracellular ribo-nucleoprotein aggregates consecutive to thermal stress. The tools developed allows for obtaining a statistical view of the development of these aggregates by automating the estimation of their number for a very large number of cells.