



HAL
open science

Dispositif de discrimination entre des micro-organismes et leur environnement pour une détection précoce

Marine Bouthillon

► **To cite this version:**

Marine Bouthillon. Dispositif de discrimination entre des micro-organismes et leur environnement pour une détection précoce. Biotechnologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAD005 . tel-03270855

HAL Id: tel-03270855

<https://theses.hal.science/tel-03270855>

Submitted on 25 Jun 2021

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.

ÉCOLE DOCTORALE MATHÉMATIQUES, SCIENCES DE
L'INFORMATION ET DE L'INGÉNIEUR
Laboratoire ICube - Merck

THÈSE présentée par :
Marine BOUTHILLON
soutenue le : 29 janvier 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline : Sciences de l'ingénieur
Spécialité : Image et Vision

**Dispositif de discrimination entre des
micro-organismes et leur environnement
pour une détection précoce.**

CONFIDENTIEL

THÈSE co-dirigée par :
Mr COLLET Christophe Professeur, Université de Strasbourg
Mr TAKAKURA Yoshitate Maître de conférence (HDR), Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Mr BUREL Gilles Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Mr STOLZ Christophe Maître de conférence (HDR), Université de Bourgogne

MEMBRE INVITÉ :
Mr FELDEN Luc Responsable de *Software and Electronics*, Merck

Remerciements

Je souhaite remercier pour commencer l'ANRT pour le financement de cette thèse CIFRE. On entend souvent parler d'un tel projet comme d'un bateau, parfois en pleine tempête, qu'on doit ramener au port. Dans mon cas, je parlerai plutôt d'un catamaran, avec une coque Merck et une coque lCube.

Il fallait donc ces deux parties pour lancer le projet, et je les remercie d'avoir permis que cela se fasse au sein de leurs structures. Je salue tout particulièrement mes armateurs, Michel De Mathelin d'une part et Pierre Woehl d'autre part.

Bien sûr, sans navigateurs expérimentés et disponibles, mon catamaran ne serait pas allé bien loin. Merci à Christophe Collet, Yoshitake Takakura et Luc Felden de s'être autant investi dans les manœuvres et d'avoir accepté de les diriger.

Pour pouvoir naviguer et aller là où il veut, un bateau doit être homologué. Pour cela, moi, je dois faire évaluer mon travail. Je remercie vivement mes deux rapporteurs, Gilles Burel et Christophe Stolz d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Dans le rôle des officiers, que je loue pour leur persévérance dans le montage d'un tel projet, et sans qui je n'aurais pas non plus fait de thèse, Renaud Chollet et Julien Boeuf.

Un merci spécial à certains équipiers : à Marisa pour toutes les préparations et l'expertise en microbiologie, à Jean-Jacques pour toutes les pièces usinées, à Gaël pour les discussions et autres relectures, à Ola pour sa collaboration et à Antoine parce qu'entre thésards CIFRE, on se comprend.

Bien sûr, il y a tout le reste de l'équipage, sans qui ni le résultat, ni l'ambiance à bord ne seraient les mêmes : Manue, Fabrice, Christophe, Sophie, Jean, Carole, Fabien, Fred, Stéphane, Yves, Gérard, Esther, Gaëlle, Emmanuelle, Céline, Mathilde, Gaëtan, Didier, Sylvain, Mathieu, Monika, Alix, Pierre-Henri, Jean-Baptiste, Thanh, Hassan, Vincent, Sylvain, Loïc, Vincent, Étienne, Yves.

Finalement, il y a tous ceux qui sont restés au port, qui m'ont soutenue avant et pendant la thèse... et qui, pour certains, ont hâte que je rentre au port ! Merci donc à Florian, à mes parents, à Hélène, Florian et Pierre, à Véro et Denis, à Romain et aux Ch'tis, aux Normands, aux Bretons et aux Alsaciens que je n'ai pas cités mais qui se reconnaîtront !

Table des matières

Remerciements	i
Table des figures	vi
Liste des tableaux	xii
Notations	xv
Glossaire et abréviations	xvi
Brevets et publications	1
Introduction	3
L'industrie pharmaceutique et le test de stérilité	3
Merck	3
Le besoin	4
Problématique de la thèse	6
Résolution de la problématique et annonce du plan	7
1 État de l'art et conception	9
1.1 Détection et comptage de colonies	9
1.2 Méthodes de mesure tridimensionnelle	12
1.3 Choix de la triangulation	16
1.4 Choix des éléments	17
2 Comparaison LED/laser	21
2.1 Génération de ligne	21
2.2 Ligne	23
2.2.1 Mesures du profil de la ligne	23
2.2.2 Mesure de la distribution de la lumière sur la ligne	25
2.3 Acquisitions sur membrane seule	26
2.4 Acquisitions sur membrane en présence d'objets	28
2.4.1 Acquisitions sur membrane avec micro-sphères	28
2.4.2 Acquisitions sur membrane avec colonies	30

3	Mise en œuvre finale et acquisitions dynamiques	35
3.1	Le prototype complet	35
3.1.1	Réalisation	35
3.1.2	Parcours de la membrane	36
3.2	Stratégie d'acquisition et contrôle-corréction de position	38
3.2.1	Introduction et définition du problème de position	39
3.2.2	Méthode	41
3.2.3	Résultats et performances	42
3.3	Acquisitions en conditions réelles	45
3.3.1	Description du procédé pour le nouveau test de stérilité	45
3.3.2	Cas des membranes HA et HV	45
3.3.3	Cas des membranes HA et HV en présence de colonies	47
4	Algorithme pour la détection	51
4.1	Présentation des données	51
4.1.1	Correction	52
4.1.2	Artefacts	52
4.2	État de l'art	54
4.2.1	Les différents contextes de l'apprentissage	56
4.2.2	Les différentes techniques de détection	57
4.3	Présentation d'une méthode basée sur un modèle	59
4.3.1	Les champs aléatoires gaussiens	59
4.3.2	Utilisation de la caractéristique d'Euler	61
4.3.3	Évaluation de la pertinence des objets détectés par un test statistique	61
4.4	Choix d'une méthode basée sur la proximité ou sur la SVDD	62
4.4.1	Données synthétiques	63
4.4.2	Choix de descripteurs	63
4.4.3	Test des méthodes basées sur le LOF, les kNN et les SVM	64
4.4.4	Mise en œuvre du LOF et résultats sur les données synthétiques	65
5	Données réelles : résultats et performances	71
5.1	Les données	71
5.2	Résultats	72
5.2.1	Méthode MaLOT	73
5.2.2	Méthode CAG	77
5.3	Performances et discussion	78
5.3.1	Performances de la méthode MaLOT	78
5.3.2	Performances de la méthode CAG	80
5.3.3	Discussion	84
	Conclusion et perspectives	89
	Conclusion	89
	Perspectives	90

A	Triangulation, équations	93
B	Profondeur de champ	95
C	Paramètres de la caméra	97
D	Article	99

Table des figures

1	Étapes du test de stérilité actuel.	5
2	Schéma simplifié du nouveau canister.	8
1.1	Milieux de culture liquide.	10
1.2	Milieux de culture solide, dans une boîte de Petri sans membrane, sur différentes géloses. Des différences entre les micro-organismes sont observables, ainsi que l'inhomogénéité de la croissance sur toute la surface. Cela est lié à la méthode d'étalement de l'échantillon sur la surface de la gélose.	10
1.3	Milieux de culture solide, dans une boîte de Petri avec membrane.	11
1.4	La même membrane vue en fluorescence avec les réactifs (a) et en conditions normales (b). Le contraste entre le fond et les colonies est meilleur dans l'image (a).	11
1.5	Schéma extrait de [Bae <i>et al.</i> , 2009] expliquant le principe d'une méthode basée sur l'étude des figures de diffusion des colonies.	12
1.6	Délai Connaissant la vitesse de la lumière, il est possible (principe du sonar) d'envoyer un pulse lumineux (avec un laser) et de mesurer le temps t_d que celui-ci met à revenir au capteur. Comme ce temps est proportionnel à la distance parcourue, nous pouvons en déduire la mesure relative de la hauteur entre la sonde et un point de la surface considérée. En parcourant cette dernière entièrement, nous obtenons sa topographie complète.	13
1.7	Flou Le flou en un point d'une image est proportionnel à la distance entre le point correspondant de la surface et un plan de cette même surface qui est net dans l'image. Plusieurs images de la surface prises pour différentes distances focales (f) peuvent donc être utilisées afin d'en déduire la topographie de la surface en analysant le flou. La méthode active consiste à projeter un motif sur la surface et à mesurer le flou de ce motif. Pour la méthode passive, le flou de l'image est utilisé en s'appuyant sur la texture de la surface. Cette méthode est la base de l'imagerie confocale.	13

1.8	Interférométrie et Moiré Un dispositif dont la figure d'interférence théorique est connue est utilisé. La surface à mesurer est placée dans le système. Ceci induit une déformation de la figure qui est liée à la topographie de la surface. Cela permet donc de la mesurer. Trois interférogrammes issus de [Acosta <i>et al.</i> , 2006] sont présentés ici. Les franges d'interférence montrent les formes de lentilles de contact à sphère positive (a), torique (b) et après une exposition à l'air(c). Ce principe peut aussi être appliqué en se basant sur l'analyse de figure de Moiré éventuellement combinée à l'utilisation des relations de triangulation.	14
1.9	Ombres En réalisant plusieurs acquisitions d'une même surface tout en faisant varier la direction de l'éclairage, différentes ombres correspondant à des profils de la surface peuvent être obtenues. À partir de ces ombres, et connaissant la position des sources d'éclairage utilisées, les distances dans l'image peuvent être évaluées et les déformations mesurées. Plus la surface est lisse et plus les positions d'éclairage sont choisies proches du plan de celle-ci, afin de maximiser la taille des ombres et donc la résolution du système.	14
1.10	Triangulation laser Un laser peut être utilisé pour projeter un point ou une ligne sur la surface. Un capteur observe la scène sous un angle différent et en mesurant la position de l'image du point (ou de la ligne) sur le capteur, sa hauteur peut être déduite. En balayant toute la surface, sa topographie complète est reconstruite.	15
1.11	Stéréo-vision et photogrammétrie En s'inspirant de l'être humain qui perçoit la profondeur grâce à sa vision binoculaire, plusieurs acquisitions de la surface sont réalisées sous différents angles de vue. Des points particuliers de la scène et qui sont présents dans les différentes images sont utilisés pour estimer la topographie recherchée suivant la procédure décrite.	15
1.12	Projection de lumière structurée Si un motif connu est projeté sur une surface (a), et que celle-ci est imagée sous cet éclairage, les déformations du motif correspondent à la topographie de la surface. Le motif projeté peut être un nuage de points, des bandes, un damier, des cercles, etc. et permet d'acquérir la totalité de la surface en une seule fois. La méthode la plus utilisée consiste à projeter des franges, ce qui donne après post-traitement, l'image (b) extraite de [Scharstein et Szeliski, 2003].	15
1.13	Description d'un système de triangulation montrant le parcours du rayon incident et l'angle de triangulation $\phi = \alpha + \beta$. Le schéma est inspiré de Costa [2012]. . .	17
1.14	La triangulation : schéma et résolution.	18
1.15	Membrane en PVDF scannée par un dispositif à longueur d'onde rouge. La hauteur mesurée est représentée en niveaux de gris et les points rouges correspondent aux points non mesurables. (a) membrane en cellulose et (b) membrane en PVDF. . .	18
1.16	Caméra Photonfocus : processus d'estimation de la hauteur à partir de l'image. . .	19
1.17	Premier prototype d'acquisition équipé de la caméra Photonfocus choisie.	20
2.1	Systèmes optiques de génération de ligne utilisant un laser (a) ou une LED (b). . .	22
2.2	Image des lignes laser (a) et LED (b) sur le CMOS, représentées à la même échelle.	23
2.3	Profil des lignes laser (a) et LED (b).	24

2.4	Dispositifs pour l'expérience du couteau.	24
2.5	Profils des lignes laser (a) et LED (b).	25
2.6	Homogénéité des lignes laser (a) et LED (b). La zone d'intérêt (délimitée par les traits verticaux) de la ligne laser mesure 31.5 mm, celle de la LED 17.5 mm.	25
2.7	Acquisitions sur les membranes HA et HV avec le laser, le laser avec un filtrage de Lee et la LED. Les images sont mises à la même échelle ([0 1]). En encart, les histogrammes (tous représentés selon le même axe des abscisses) et les valeurs d'écart type (σ) calculés pour une fenêtre de 100x100 pixels prise au centre de l'image.	27
2.8	Acquisitions sur membrane HA et HV pour des micro-sphères de taille 50 et 75 μm avec deux agrandissements centrés sur une micro-sphère. Les images sont mises à la même échelle.	29
2.9	Acquisitions sur membrane HA avec le laser et la LED pour différentes tailles de micro-sphères. Les images sont mises à la même échelle.	31
2.10	Acquisitions sur membrane HV avec le laser et la LED pour différentes tailles de micro-sphères. Les images sont mises à la même échelle.	32
2.11	Acquisitions sur membrane HV avec le laser et la LED sur des colonies de micro-organismes. Les images sont mises à la même échelle, et ont subi la même séquence de pré-traitements que pour les acquisitions sur micro-sphères.	33
2.12	Présentation des membranes avec colonies de <i>D.anomala</i> après la troisième acquisition.	34
3.1	Dispositif d'acquisition avec tous les éléments choisis, de haut en bas : table linéaire, table de rotation, pince de saisie et de maintien des membranes, ligne LED avec son radiateur, caméra avec l'optique choisie.	36
3.2	Présentation des prototypes réalisés.	37
3.3	Parcours de la membrane envisagés	38
3.4	Parcours de la membrane utilisé pour notre système. Les zones scannées se recouvrent mutuellement, ce qui garantit de scanner la totalité de la membrane, mais crée une redondance non négligeable dans les données. En effet, la surface de la membrane mesure 1734 mm^2 alors que la surface scannée est de 4000 mm^2 . Les données redondantes correspondent à 57% de la surface acquise. Certaines zones sont en effet parcourues jusqu'à 8 fois, comme le centre, et le scan est prolongé en dehors de la membrane.	39
3.5	Acquisition sur une membrane avec colonies (entourées) et particules. Il est difficile de différencier les deux sans information supplémentaire.	39
3.6	Principe général des acquisitions garantissant un faible taux de faux positifs. Les points noirs correspondent aux objets présents et les flèches pointent les détections. En comparant les objets détectés à T_0 et à T , il est possible de les discriminer.	40
3.7	Image en couleur et acquisition correspondante.	42
3.8	Sélection de la zone d'intérêt et transformation vers un repère polaire.	43
3.9	Estimation de l'angle.	43

3.10 Valeurs d'angles estimées grâce à l'algorithme sur des données dont le décalage en rotation est connu.	44
3.11 Étapes du nouveau test de stérilité	46
3.12 Surfaces mesurées des deux types de membranes, représentées à la même échelle, avec les histogrammes correspondants, également représentés à la même échelle. .	47
3.13 Acquisitions sur membranes HA et HV en présence de deux micro-organismes sur deux milieux de culture. Les durées d'incubation (D_i) sont différentes car la croissance des micro-organismes dépend de chacun d'eux. Dans les cas où ceux-ci sont plus développés, aucun pré-traitement n'est appliqué car le bruit est alors négligeable par rapport au signal correspondant aux colonies. Les colonies les plus petites sont entourées en rouge et l'échelle des couleurs correspondant à la hauteur pour chaque image est donnée.	48
4.1 De l'acquisition aux données prêtes pour la détection. Les deux types de membrane sont présentés. Dans les deux cas, des artefacts sont présents sur la surface. Pour la membrane HV, on remarque même des structures ponctuelles organisées en lignes obliques. Elles apparaissent sur la membrane pendant sa fabrication, quand celle-ci est mise à sécher sur des tambours micro-perforés.	53
4.2 Histogrammes correspondant à la distribution des mesures de hauteur pour chacune des deux membranes. En encart, comparaison quantile-quantile entre ces distribution (centrées et réduites) et la distribution gaussienne standard.	54
4.3 Présentation des différents artefacts sur membrane HA : marquage du drain (D) en forme de 'U' concentriques, effet d'un pli (P), signal correspondant à une goutte (G) sur le couvercle ou à une rayure (R) et enfin élévation marquée liée à la présence d'une bulle d'air (B) emprisonnée sous la membrane. Pour l'image (c), la partie gauche du couvercle est couverte de condensation (C), ce qui empêche de distinguer la membrane en dessous. La trainée jaune est un artefact provenant des pré-traitements appliqués et causé par la buée. Les acquisitions (a) et (b) ont été faites dans le dispositif de l'application et l'acquisition (c) avec une boîte de Petri, ce qui explique l'absence de marquage en U.	55
4.4 Principe de détection de données aberrantes basé sur l'utilisation d'enveloppes convexes pour trier les données.	58
4.5 Principe de détection de données aberrantes basé sur la mesure des angles de vue des objets les uns par rapport aux autres.	58
4.6 Étude du caractère gaussien des données acquises. Celui-ci est également confirmé par l'étude des moments d'ordre 3 et 4 sur des données en l'absence de colonies. Pour la membrane HA présentée ici, le coefficient de dissymétrie (<i>skewness</i> en anglais) vaut -0.03 et le kurtosis 3.33 . Pour la membrane HV, les valeurs obtenues sont respectivement de -0.11 et de 3.18 . En les comparant aux valeurs attendues pour une densité de probabilité gaussienne, qui sont respectivement de 0 et de 3 , le modèle gaussien semble en effet adapté.	60

4.7	Simulation d'un champ gaussien et visualisation de deux ensembles seuillés, pour $z = 1$ et $z = 2.5$. Les composantes connexes correspondant aux maxima sont en jaune.	61
4.8	Présentation des données synthétiques utilisées, 3 cas représentatifs sont créés. Au temps T , des colonies apparaissent.	64
4.9	Schéma d'explication de la méthode de calcul du LOF. L'exemple est donné pour un nombre de voisins $k = 4$ et calculé pour le point à classer x_i (en gris) par rapport aux points d'apprentissage (en noir). Le LOF pour le point considéré sera autour de 1.	66
4.10	Résultats sur les données synthétiques. En haut le calcul du LOF à partir des données du maximum par bloc (blocs de 5 pixels et pour $k = 5$ voisins) et en bas le résultat après le seuillage par la méthode d'Otsu. Dans tous les cas, la vérité terrain est de 3 colonies. On note que les résultats correspondent à la réalité et que la particule n'est pas détectée	67
4.11	Résultats sur les données synthétiques ne présentant pas de colonie. En haut les données et en bas le calcul du LOF à partir des données du maximum par bloc (blocs de 5 pixels et pour $k = 5$ voisins) et le résultat après le seuillage par la méthode d'Otsu. Le résultat présente de nombreux faux positifs.	68
5.1	Nuage de points correspondant aux valeurs de $t2a$ et de $t2b$. Les croix rouges correspondent aux données positives, et les noires aux données négatives. Les zones en jaune et en vert sont le résultat de la classification par le SVM linéaire. Les points en $(0, 0)$ correspondent aux cas pour lesquels $t2a$ et $t2b$ n'ont pas été calculés car le test préliminaire $t1$ était positif.	74
5.2	Illustration de la détection d'une colonie à 5 jours. Malgré la présence d'un artefact, la colonie est détectée.	76
5.3	Illustration des différentes erreurs rencontrées lors de la détection par la méthode MaLOT sur la base de donnée $T0/T$	77
5.4	Illustration des différentes erreurs rencontrées lors de la détection par la méthode MaLOT sur les séquences. Cas des faux positifs.	81
5.5	Illustration des différentes erreurs rencontrées lors de la détection par la méthode MaLOT sur les séquences. Cas des faux négatifs.	82
5.6	Illustration de deux détections correctes rencontrées lors de la détection sur les séquences par la méthode CAG.	83
5.7	Illustration de deux détections erronées rencontrées lors de la détection sur les séquences par la méthode CAG.	84
A.1	Description d'un système de triangulation, parcours du rayon incident.	93

Liste des tableaux

2	Extrait du cahier des charges concernant le système de détection	6
3	Liste des micro-organismes utilisés pour les tests. Pour chacun d'eux, nous précisons son type : bactérie (B), moisissure (M) ou levure (L); le milieu de culture utilisé à Merck pour le faire pousser et le milieu qui permet de le détecter dans le test de stérilité; s'il se développe en environnement (E) aérobie (A) ou anaérobie (ANA); la température (T) et la vitesse (V) à laquelle il se développe pour le test de stérilité. Enfin une indication est donnée sur la couleur et la forme du micro-organisme s'il se développe dans les conditions décrites, pour le milieu utilisé (sur membrane).	7
1.1	Résumé des principales méthodes de détection de micro-organismes.	12
1.2	Résumé des différents paramètres choisis pour les réglages du système.	20
2.1	Longueurs d'onde disponibles.	22
2.2	Bruit mesuré en fonction de la vitesse de translation, du type de membrane et de la longueur d'onde du laser. Les valeurs données correspondent à l'écart-type évalué sur les données de hauteur acquises en dynamique.	22
2.3	Caractéristiques des micro-sphères et pas d'acquisition utilisés lors de l'acquisition. Le diamètre moyen (D_{moy}) et l'écart type (σ) fournis par le constructeur Phosphorex pour le lot utilisé sont donnés pour chaque taille de micro-sphère théorique (D_{MS}).	28
2.4	Résumé des résultats observés avec les micro-sphères. Certaines acquisitions (n_a) n'ont pas été faites. Les scans où les colonies ne sont pas visibles sont repérés par -, ceux où elles sont visibles par + et les cas limites où elles commencent à apparaître par =.	30
4.1	Résumé des résultats des tests des différentes méthodes sur des données synthétiques idéales (I), avec particule (C) et décalées (T). Deux jeux de descripteurs sont utilisés, la combinaison position+maximum par bloc et la combinaison position+écart-type par bloc (σ). Les données présentent toutes 3 colonies à T . Les valeurs dans le tableau indiquent le nombre de colonies détectées. Une valeur différente de 3 correspond donc à une erreur de détection. Les cas signalés par un a correspondent à des effets de bord conduisant à des détections. Ceux-ci pouvant être traités, ils ne sont pas pris en compte dans l'évaluation.	65

5.1	Description des données utilisées pour les tests. La séquence 5 n'est pas mentionnée car elle ne présente que quelques acquisitions au début et une seule à la fin, réalisée après 7 jours d'incubation, suite à une erreur du système.	73
5.2	Résultats de la détection par la méthode MaLOT avec tri par seuillage sur la moyenne et la variance des données détectées. Données $T0/T$	73
5.3	Résultats de la détection par la méthode MaLOT avec tri par seuillage sur le rapport entre le nombre de pixels détectés et le nombre d'objets et la variance des pixels classés comme fond. Données $T0/T$	75
5.4	Résultats des classifieurs testés	75
5.5	Résultats de la détection par la méthode MaLOT, avec tri par classification par SVM linéaire. Données $T0/T$	76
5.6	Résultats de la détection basée sur la méthode CAG. Données $T0/T$	78
5.7	Résultats de la détection par la méthode MaLOT avec tri par classification par SVM linéaire. Données en séquences complètes.	79
5.8	Retard du temps de première détection par l'algorithme MaLOT par rapport à la vérité terrain. Le cas 1 peut être écarté pour cette estimation car nous ne disposons pas des données 20 à 29 ni 44 à 47, ce qui induit une incertitude sur le moment exact de la détection pour la vérité terrain comme pour l'algorithme. Dans le cas 3, l'apparition de buée sur les acquisitions 24, 25, 27 et 31 joue probablement un rôle dans le retard de détection.	79
5.9	Résultats de la détection basée sur la méthode CAG. Données en séquences complètes.	83
5.10	Tableau de comparaison des deux algorithmes.	85
5.11	Tableau de comparaison des résultats obtenus par les algorithmes basés sur le Local Outlier Factor (LOF) et sur les Champs Aléatoires Gaussiens (CAG) sur une séquence d'acquisition. Dans la colonne VT (Vérité Terrain), les - désignent les acquisitions qui ne présentent pas de colonies et les + les cas où il y en a. Pour chacun des deux algorithmes, la valeur reportée donne le nombre d'objets détectés.	86

Notations

T_0	Acquisition réalisée juste après la filtration, avant l'incubation du dispositif
T_i	Acquisitions réalisées au cours de l'incubation du dispositif
T	Acquisition finale, après 5 jours d'incubation du dispositif
S	Support de l'image
x ou x_i	Pixel dans l'image de l'image
$Z(x)$	Hauteur mesurée au pixel x dans l'image S
$E[.]$	Espérance
C	Matrice de covariance
$ \cdot $	Déterminant
$A_z(Z, S)$	Ensemble seuillé de seuil z du champ aléatoire gaussien Z dans S
Λ	Matrice de variance - covariance
$\lambda(\cdot)$	Surface
$P(\cdot)$	Probabilité
$N(x_i, k)$	k -voisinage de x_i
d	Distance
d_a	Distance d'accessibilité
ρ	Densité
δ	Dissimilarité
ϵ	Taux d'erreur

Glossaire

CAG	Désigne l'algorithme basé sur les champs aléatoires Gaussiens, 64, 67, 69, 80–82
CFU	colony forming unit, 30, 67
CMOS	<i>Complementary metal-oxide-semiconductor</i> , 19, 23
EM	<i>Expectation-Maximization</i> , 55
fps	fps <i>frames per second</i> , images par seconde, 19, 35
FTM	<i>Fluid Thioglycollate Medium</i> , milieu liquide, 5
FWHM	<i>full width at half maximum</i> , largeur à mi-hauteur, 23
HA	Référence interne de Merck pour la membrane en esther de cellulose, 24–26, 28, 45, 46, 50, 67
HV	Référence interne de Merck pour la membrane en PVDF, 21, 25, 26, 28, 30, 45, 46, 50, 67, 80
LED	<i>light-emitting diode</i> , diode électro-luminescente, xiii, 6, 21–26, 28, 30, 33–35, 83, 84
MaLOT	Désigne l'algorithme basé sur le calcul du max par bloc, le Local Outlier Factor, le seuillage d'Otsu et un Tri des objets, 64, 67, 79–82, 84
PVDF	polyfluorure de vinylidène, vii, 18, 26
R2A	<i>Reasoner's 2A</i> , milieu solide, 46
SVM	<i>Support Vector Machine</i> , Séparateur à Vaste Marge, 7, 56, 59, 61, 70, 71, 80, 83

TSA	<i>Trypticase soy agar</i> , milieu solide, 30, 46
TSB	<i>Trypticase soy broth</i> , milieu liquide, 5

Brevets et publications

Brevets déposés :

- **WO 2015/161914 A2** : Method for detecting micro-colonies growing on a membrane or an agarose medium of a sample and a sterility testing apparatus (Référence interne Merck) [Felden *et al.*, 2014].
- **P15/189** : A Method for Early Detection and Identification of Microbial-Colonies, apparatus for performing the method and computer program (Référence interne Merck) [Felden *et al.*, 2015].

Articles soumis :

- Marine Bouthillon, Yoshitate Takakura, Ola Ahmad, Luc Felden, Christophe Collet. LED based 3D imaging device to observe colonies of micro-organisms. *Soumis au Journal of Food Engineering* [Bouthillon *et al.*, 2015]. Correspond au Chap.2, texte disponible en annexe (Ann.D).
- Ola Ahmad, Marine Bouthillon, Yoshitate Takakura, Christophe Collet. Automatic early detection of microbiological contamination from topographic surface roughness using random field modeling. *Soumis à IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [Ahmad *et al.*, 2015].

Introduction

L'industrie pharmaceutique et le test de stérilité

L'industrie pharmaceutique mondiale est très dynamique, notamment grâce aux pays émergents où la population accède petit à petit aux soins grâce à la hausse de son niveau de vie. Le vieillissement de la population augmente également les besoins mondiaux en terme de soins et donc de médicaments. Le marché global continue à croître, passant de 559.9 milliards de dollars en 2004 à 1057.2 en 2014, première année où il dépasse les 1000 milliards de dollars annuels (données Statista [2015]). Les prévisions continuent dans ce sens avec une croissance estimée entre 4 et 7% par an d'ici à 2018 concernant les dépenses pharmaceutiques dans le monde (données Health [2014]).

Ce développement reflète l'augmentation de la consommation mondiale de médicaments et donc le besoin de les produire pour suivre cette tendance. Puisque l'on parle ici de la santé de chacun, l'encadrement des pratiques de fabrication est depuis longtemps au cœur de la préoccupation des grands laboratoires pharmaceutiques et des gouvernements. Les agences responsables des autorisations de mise sur le marché des médicaments s'occupent également de définir des normes pour s'assurer de la qualité des produits fabriqués. Ces organisations sont par exemple la *Food and Drug Administration* américaine, l'*European Medicines Agency*, le *Ministry of Health, Labor and Welfare* au Japon ou au niveau international la *World Health Organization*.

Il n'est pas question ici de la sûreté ni de l'efficacité des médicaments. Nous nous intéressons par contre aux moyens mis en œuvre pour en assurer la stérilité, c'est-à-dire s'assurer que des bactéries ou autres contaminants ne viennent pas s'ajouter dans les vaccins, solutions injectables et autres médicaments. Ces contaminants peuvent apparaître tout au long du cycle de vie du médicament, que ce soit dans les matières premières utilisées ou en cours de fabrication, en provenance de l'environnement de production ou d'opérateurs. Les moyens de lutter contre ces contaminations croisées sont par exemple la production en salle blanche (salle propre selon la norme ISO 14644-1), le port de combinaisons, gants, masques et autres dispositifs pour les opérateurs ou, bien sûr, la stérilisation des produits en cours et/ou en fin de fabrication. Cependant, la meilleure garantie pour les patients reste la vérification, et c'est pourquoi chaque lot de médicament doit être contrôlé avant de pouvoir être commercialisé. C'est le test de stérilité.

Merck

La thèse que vous allez découvrir dans ce manuscrit s'est déroulée au sein de l'entreprise Merck, dans le cadre d'un contrat CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche).

Merck est un groupe industriel international qui s'intéresse à la pharmacie, à la chimie et aux sciences de la vie à travers sa branche *Life Science*. C'est à ce dernier domaine que se rapporte mon projet, et plus précisément aux dispositifs permettant de surveiller la bio-contamination, que ce soit dans un produit ou dans l'air. En particulier, nous nous intéressons au test de stérilité. Merck a conçu et propose une plateforme permettant de procéder à ce test. Elle est constituée d'un dispositif de filtration et d'incubation et d'une pompe péristaltique (Fig.1a).

La pompe permet de transférer les différents fluides, comme l'échantillon et divers liquides de rinçage. Le dispositif de filtration créé par Merck est appelé canister (Figs.1a et c) et contient une membrane poreuse (dans la partie colorée). Le diamètre des pores est d'environ $0.45 \mu m$, ce qui permet de retenir les éventuels contaminants présents dans l'échantillon.

Le processus de préparation de l'échantillon est adapté et validé pour chaque client car il est lié au type de produit à tester et aux spécificités de production. Cependant il suit globalement le schéma décrit Fig.1. Des échantillons du produit à tester sont prélevés dans chaque lot. Si besoin, ils sont dissous ou préparés de manière à être filtrés (poudres, gélules, crème). La filtration est ensuite réalisée. Afin d'être sûr que les éventuels contaminants sont sur la membrane, une ou plusieurs solutions sont filtrées pour rincer la tubulure, et également la membrane. C'est une étape importante, car elle permet d'éviter l'apparition d'interactions avec les éventuels contaminants. Des antibiotiques pourraient par exemple empêcher le développement de contaminants comme les bactéries. L'étape suivante consiste à mettre la membrane en contact avec une solution nutritive permettant la croissance des micro-organismes, c'est-à-dire leur multiplication. On utilise donc la pompe pour remplir le canister d'un tel produit, appelé milieu de culture. Enfin, le canister est séparé de la tubulure et placé dans un incubateur (enceinte dont la température et le taux d'humidité sont contrôlés, Fig.1b). Afin de prévenir toute contamination extérieure (dite croisée), la filtration est le plus souvent faite en environnement contrôlé (hotte à flux laminaire, isolateur,...) et le canister est fermé et reste clos pendant toute la suite du test. Après une période validée par le client, mais d'au moins 14 jours, le canister est sorti de l'incubateur et un opérateur observe le milieu de culture. Si celui-ci est resté limpide et intact, le test est déclaré négatif et le lot correspondant peut être mis sur le marché. Dans le cas contraire, le milieu s'est troublé ou des colonies y ont formé des structures visibles (filaments, nuages, amas), le test est déclaré positif. Dans ce cas, le lot est détruit et le contaminant est identifié afin de comprendre d'où il vient et de pouvoir y remédier.

Le besoin

Il est clair que la réduction du temps d'incubation est un enjeu économique majeur pour l'industrie pharmaceutique. Le coût du stockage des produits pourrait ainsi être réduit. De plus, cela apporterait un délai supplémentaire de conservation chez le client pour les produits dont la durée de vie est courte. Or, réduire ce temps d'incubation conduit à donner moins de temps aux micro-organismes pour se multiplier. Ceux-ci étant moins nombreux, ils sont donc moins visibles. Au cours de l'incubation, les micro-organismes commencent par connaître une phase de latence pendant laquelle ils s'habituent à leur environnement. Cette phase peut durer jusqu'à quelques dizaines d'heures. Ils commencent ensuite à se multiplier et leur nombre croît de manière

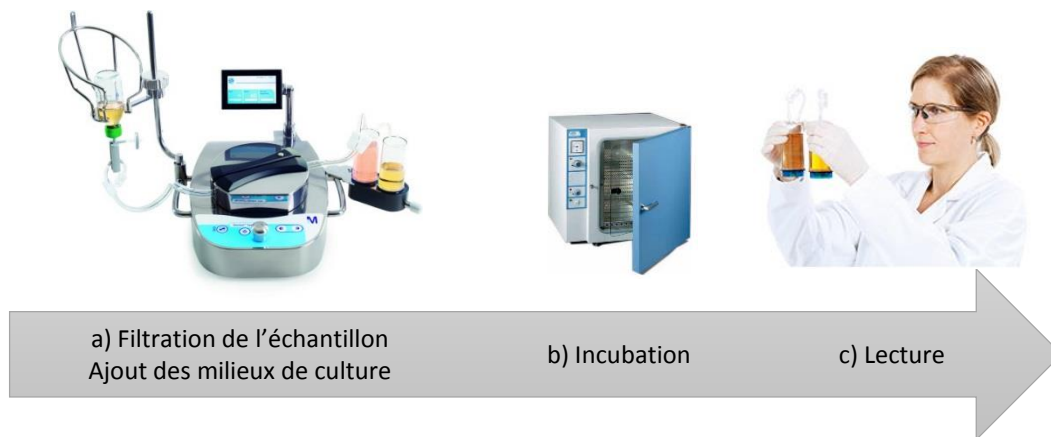


Figure 1 – Étapes du test de stérilité actuel.

exponentielle. Ce qui veut dire que lorsque la période d'incubation est réduite, le nombre de micro-organismes est beaucoup plus faible et donc plus difficile à détecter.

Par ailleurs, la méthode est opérateur-dépendante puisque c'est lui qui gère tout depuis la filtration jusqu'à l'observation. C'est donc pour rendre la détection plus robuste et le processus mieux traçable, mais aussi pour être capable de voir les micro-organismes plus tôt que Merck a lancé le projet de concevoir une nouvelle plateforme de test de stérilité.

La réalisation d'un tel dispositif nécessite à la fois des compétences liées au savoir-faire de Merck comme la microbiologie ou les systèmes de filtration, mais aussi des connaissances d'autres domaines comme le traitement d'image. Le projet s'est donc inscrit dans un contexte plus large. Un consortium a été mis en place, regroupant des partenaires industriels (Merck et Thurmelec) et des partenaires académiques (le laboratoire ICube et le laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie) à travers deux thèses CIFRE rattachées à l'Université de Strasbourg.

Merck s'est occupé de développer le dispositif destiné à remplacer le canister. L'entreprise Thurmelec a conçu la partie du système destinée à manipuler les nouveaux canisters afin de les préparer et de les charger dans le système de lecture.

Une première thèse [Gillmann, 2015], en microbiologie, consistait à concevoir une combinaison de deux milieux de culture synthétiques spécifiques au test de stérilité. Aujourd'hui, les milieux de culture utilisés pour le test de stérilité sont le FTM et le TSB. Il y a deux milieux car le test de stérilité doit présenter des conditions permettant de faire croître tous les micro-organismes. Il n'est pas possible de les détecter avec une seule configuration. Un test est donc constitué de deux canisters, c'est-à-dire deux membranes. L'échantillon de départ est séparé au cours de la filtration. Les unités sont remplies chacune avec un milieu de culture et incubées à des températures différentes (22.5 °C pour le TSB et 32.5 °C pour le FTM). Ces milieux contiennent des éléments d'origine animale ou végétale (soja, viande, sang, lait,...), ce qui fait que leur formulation n'est pas connue de manière exacte. Ils sont dits "complexes". Ces constituants indéfinis rendent la formulation du milieu de culture variable, et une version synthétique permettrait au contraire une formulation maîtrisée et stable. Cette thèse a été soutenue en Janvier 2015 [Gillmann, 2015]. Après avoir conçu deux milieux synthétiques semblables aux milieux existants, un des enjeux de cette thèse a été d'en améliorer la formulation pour permettre aux micro-organismes de se développer

plus rapidement. Ce qui rejoint la problématique de détection précoce qui nous intéresse ici et que nous allons détailler dans la section suivante.

Problématique de la thèse

La seconde thèse liée au projet de Merck, que nous présentons tout au long de ce document, vise à la conception d'un système de vision permettant la détection précoce des éventuels contaminants dans le cadre du test de stérilité. La modernisation de ce test cherche à répondre au besoin de l'industrie en méthodes dites "rapides". La nouvelle plateforme de test de stérilité doit donc suivre un cahier des charges qui se base sur les normes en vigueur, en y ajoutant les caractéristiques liées à l'automatisation et à une telle méthode.

Le nouveau système doit garder les caractéristiques de l'ancien, comme le débit de filtration, l'utilisation de deux conditions de croissance ou les performances en terme de faux positifs et faux négatifs. Le dispositif contenant la membrane doit être clos, permettre la filtration, l'ajout de milieu de culture, l'incubation et la lecture du résultat. En cas de test positif, la membrane doit pouvoir être ré-incubée pour identifier le contaminant. Ceci implique que la détection doit être non-destructrice. Le système de lecture doit de plus permettre de détecter les colonies après un maximum de 5 jours d'incubation et être suffisamment peu encombrant pour tenir sur une paillasse. Il doit également permettre une acquisition rapide et garantir de hautes cadences journalières (par exemple jusqu'à une centaine de tests, soit 200 unités lues quotidiennement pour certains clients).

Concernant la partie détection du système, le but à atteindre est donc de discriminer les micro-organismes par rapport à leur environnement afin de les détecter de manière rapide et précoce. Les spécifications décrites dans le Tab.2 décrivent les attentes liées ou ayant un impact sur le système de détection. La validation des technologies et méthodes choisies est faite en suivant les recommandations des organismes normatifs en vigueur. Dans ce contexte, si le test de stérilité est censé détecter tous les micro-organismes, dans le cadre du projet, une liste représentative a été définie. Parmi ces micro-organismes, 5 ont été choisis pour les tests des algorithmes au cours du développement (Tab.3) : *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis*, *Methylobacterium extorquens*, *Dekkera anomala*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*. Ils présentent des caractéristiques différentes, tant dans leurs conditions de croissance (milieu de culture, aérobie/anaérobie) que dans leur caractéristiques (vitesse de croissance, couleur, forme).

Caractéristique	Valeur
Temps d'incubation	≤ 5 jours
Temps de scan par membrane	≤ 1 min
Temps de traitement par membrane	≤ 2 min
Dispositif clos	Lecture à travers une vitre
Encombrement	Tenir sur une paillasse
Coût	35-70 k€
Deux types de membranes	HA et HV

Table 2 – Extrait du cahier des charges concernant le système de détection

Micro-organisme	Type	Milieu utilisé	Milieu TS	E	T (deg)	V	couleur	forme
<i>P. aeruginosa</i>	B	TSA	TSB	A	22.5	rapide	jaune	plat
<i>A. brasiliensis</i>	M	SDA	TSB	A	22.5	rapide	blanc	fil
<i>M. extorquens</i>	B	R2A	TSB	A	22.5	lent	rose	sphère
<i>D. anomala</i>	L	SDA	TSB	A	22.5	lent	blanc	sphère
<i>P. acnes</i>	B	COS	FTM	ANA	32.5	lent	jaune	plat
<i>E. coli</i>	B	TSA	TSB	A	22.5	rapide	jaune	plat

Table 3 – Liste des micro-organismes utilisés pour les tests. Pour chacun d'eux, nous précisons son type : bactérie (B), moisissure (M) ou levure (L) ; le milieu de culture utilisé à Merck pour le faire pousser et le milieu qui permet de le détecter dans le test de stérilité ; s'il se développe en environnement (E) aérobie (A) ou anaérobie (ANA) ; la température (T) et la vitesse (V) à laquelle il se développe pour le test de stérilité. Enfin une indication est donnée sur la couleur et la forme du micro-organisme s'il se développe dans les conditions décrites, pour le milieu utilisé (sur membrane).

Résolution de la problématique et annonce du plan

Afin de détecter les éventuels micro-organismes de manière précoce, robuste et traçable, l'automatisation de la lecture du résultat est nécessaire. Un phénomène physique à mesurer doit donc être trouvé. Le choix de la mesure de la hauteur de la surface de la membrane où se développent les micro-organismes est détaillé dans le Chap.1. Afin de rendre la mesure de hauteur plus performante, nous démontrons (Chap.2) que l'utilisation d'un dispositif lumineux à LED est plus intéressante que le laser habituellement choisi. Une image du relief de la membrane est donc acquise, où les micro-organismes forment des bosses que nous cherchons à détecter.

Proposer une méthode rapide pour la détection de contaminants est une innovation sur le marché du test de stérilité. Utiliser la mesure tridimensionnelle pour observer des colonies se développant sur une membrane dans un dispositif clos est également une application nouvelle qui a donné lieu à un brevet. Elle permet par exemple d'obtenir une méthode indépendante du contraste entre les colonies et la membrane, contrairement à une capture d'imagerie traditionnelle par caméra CMOS ou CCD. Dans le Chap.3, nous détaillons la mise en œuvre du système d'acquisition puis nous montrons les premiers résultats acquis en conditions réelles sur des micro-organismes.

Le choix de cette technologie entraîne de revoir le canister, puisque la croissance des éventuels contaminants doit à présent se dérouler sur une membrane déposée sur un milieu solide. Il est développé en même temps que le reste de la plateforme. Il est décrit Fig.2. Il comporte une cavité au-dessus de la membrane, fermée par un couvercle transparent permettant la lecture. L'échantillon est introduit par l'ouverture dans le couvercle et est filtré à travers la membrane. Le milieu de culture est ensuite introduit par le dessous. Finalement les ouvertures sont bouchées et l'ensemble est placé dans une étuve à la température adéquate.

Le défi posé par cette thèse est de détecter un événement rare tout en étant capable d'assurer qu'il n'y a aucun contaminant dans la majorité des cas. En effet, un test ne sort positif qu'une ou deux fois par an pour un fabricant qui en pratique plusieurs dizaines par jour. Concernant le traitement des images, une méthode basée sur la détection de données aberrantes est créée, combinée avec un tri basé sur un classifieur SVM. L'algorithme et l'état de l'art qui lui est

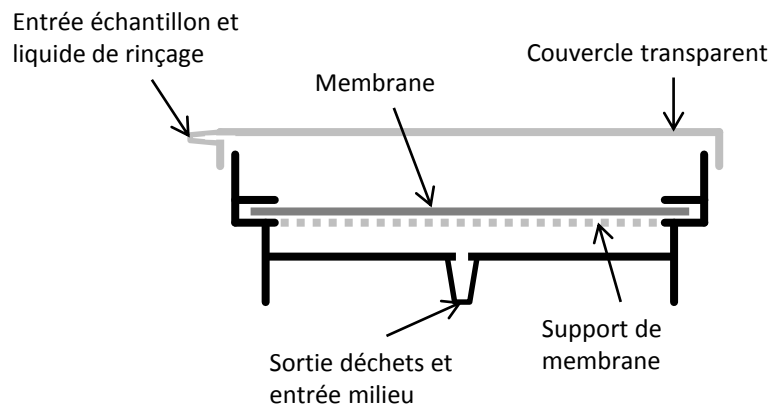


Figure 2 – Schéma simplifié du nouveau canister.

associé sont exposés dans le Chap.4. Dans ce même chapitre, une seconde méthode est exposée, basée sur les champs aléatoires gaussiens. Nous terminons en exposant au Chap.5 les résultats et performances du système sur des données acquises en conditions réelles et avec la première méthode. Ces résultats sont ensuite comparés avec ceux obtenus grâce à la seconde méthode.

Chapitre 1

État de l'art et conception

Introduction Dans ce chapitre, nous parcourons tout d'abord l'état de l'art concernant la détection et le comptage de colonies de micro-organismes (Sect.1.1), puis les méthodes de mesure tridimensionnelle (Sect.1.2). Nous nous intéressons ensuite plus particulièrement à la triangulation (Sect.1.3) et nous décrivons finalement nos choix techniques concernant la mise en œuvre du système dans la Sect.1.4.

1.1 Détection et comptage de colonies

Les méthodes de détection de micro-organismes sont nombreuses. Les méthodes dites "rapides" [Zhao *et al.*, 2014] reposent par exemple sur la détection de l'ADN après l'avoir amplifié (Réaction en chaîne par polymérase, *NASBA - Nuclear Acid Sequence Based Amplification*), sur l'utilisation des caractéristiques immunologiques des micro-organismes (spécificité de la liaison antigène-anticorps, ELISA, Lateral Flow) ou sur l'utilisation de bio-capteurs optiques [Narsaiah *et al.*, 2012], piézo-électriques ou électrochimiques. Ces méthodes ne seront pas retenues pour une application de test de stérilité car elles peuvent être destructrices pour l'échantillon, elles sont spécifiques à un micro-organisme ou car elles ne permettent pas de s'assurer que l'objet détecté était vivant. Or une cellule morte ne peut pas être considérée comme un contaminant. Un des signes de vie d'un micro-organisme, et le plus facile à observer, est sa multiplication. Des méthodes basées sur la croissance seront donc préférées. Elles placent l'échantillon dans des conditions favorisant la multiplication des potentiels contaminants. Ces méthodes cherchent à détecter non plus un micro-organisme, mais un grand nombre, le plus souvent sous forme de colonies.

Les méthodes basées sur la croissance peuvent être séparées en deux catégories, la première voyant la croissance se dérouler en milieu liquide, et la seconde sur un milieu solide. Dans le premier cas, après préparation de l'échantillon, celui-ci est ajouté directement au contact ou dans un milieu de culture liquide. Ce dernier contient les éléments nécessaires au développement des micro-organismes comme du glucose, des minéraux et divers facteurs de croissance. Au fur et à mesure de leur développement, les micro-organismes vont impacter certaines propriétés physiques du liquide, ce qui est mesurable. Cela peut être un changement de couleur, un trouble, comme dans la Fig.1.1, un changement de pH, de conductivité,...



(a) La bouteille de gauche n'a pas été inoculée, le milieu reste dans son état initial, transparent. La bouteille de droite présente un trouble, signe du développement d'un micro-organisme, ici *Bacillus subtilis*.



(b) La bouteille est vue du dessous et quelques colonies de *Staphylococcus epidermidis* sont visibles. Lorsqu'ils se développent en milieu liquide, certains micro-organismes forment des colonies aux apparences diverses : filaments, nuage, agglomérats.

Figure 1.1 – Milieux de culture liquide.

Lorsque les micro-organismes se développent sur un milieu de culture solide (gélose), ils sont soit directement déposés à la surface du milieu comme dans la Fig.1.2, soit filtrés à travers une membrane poreuse qui est déposée sur la gélose comme dans la Fig.1.3. Dans ces configurations, les micro-organismes se développent de manière compacte, en formant des colonies. Il existe dès lors différentes méthodes pour les détecter et éventuellement les compter.



(a) *Bacillus subtilis*



(b) *Staphylococcus aureus*

Figure 1.2 – Milieux de culture solide, dans une boîte de Petri sans membrane, sur différentes géloses. Des différences entre les micro-organismes sont observables, ainsi que l'inhomogénéité de la croissance sur toute la surface. Cela est lié à la méthode d'étalement de l'échantillon sur la surface de la gélose.

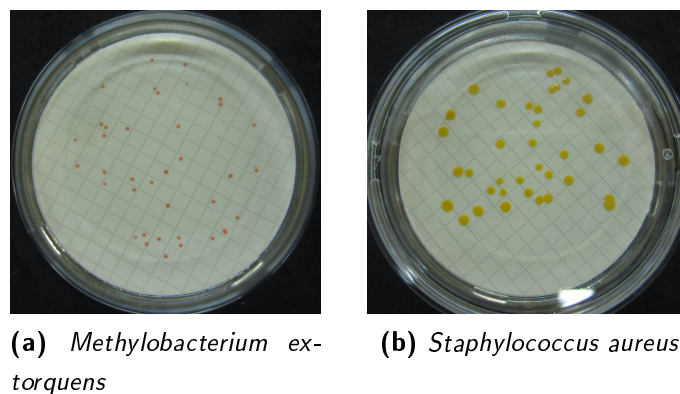


Figure 1.3 – Milieux de culture solide, dans une boîte de Petri avec membrane.

La procédure la plus intuitive est d'imager la surface et d'utiliser les méthodes de traitement d'images classiques pour y détecter les colonies. Ces méthodes donnent des résultats intéressants pour des cas où la variabilité des données est réduite et où l'éclairage est optimisé [Brugger *et al.*, 2012]. Si elles sont relativement simples à mettre en œuvre, ces méthodes sont souvent limitées à un ou deux micro-organismes ou à un seul support (combinaison membrane et milieu). Elles nécessitent souvent des pré-traitements pour améliorer le contraste entre le fond et les colonies.

La fluorescence peut être utilisée pour améliorer ce contraste. Deux familles de méthodes existent, reposant soit sur l'auto-fluorescence de certains micro-organismes, soit sur des marqueurs qui se fixent sur les micro-organismes et émettent de la lumière s'ils sont excités avec la bonne longueur d'onde [Chollet *et al.*, 2008; London *et al.*, 2010]. L'image devient alors plus facile à analyser puisque le fond émet peu de signal et que les colonies sont très lumineuses, comme illustré Fig.1.4. L'utilisation de réactifs n'étant pas toujours pratique et pouvant nécessiter l'ouverture du dispositif, la méthode développée devra s'en affranchir. Toutes ces contraintes ont également un impact sur le coût du test. C'est pourquoi la fluorescence n'est pas retenue.

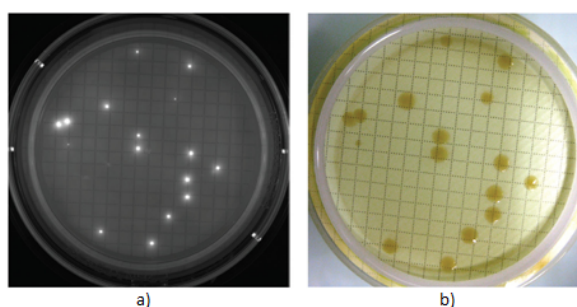


Figure 1.4 – La même membrane vue en fluorescence avec les réactifs (a) et en conditions normales (b). Le contraste entre le fond et les colonies est meilleur dans l'image (a).

Dans le cas où aucune membrane n'est utilisée, les colonies ont pu être détectées voir identifiées en se basant sur l'étude des figures de diffusion d'un faisceau laser à travers la boîte de Petri [Bae *et al.*, 2009], illustrée Fig.1.5. Une limite de cette technique est donc bien la nécessité de ne pas utiliser de membrane. Ces méthodes sont de plus basées sur l'apprentissage et nécessitent la création d'une base de donnée regroupant tous les cas possibles. Or la variabilité des données en

microbiologie ne permet pas d'être certain de l'exhaustivité d'une telle base. Ce n'est donc pas adapté au test de stérilité.

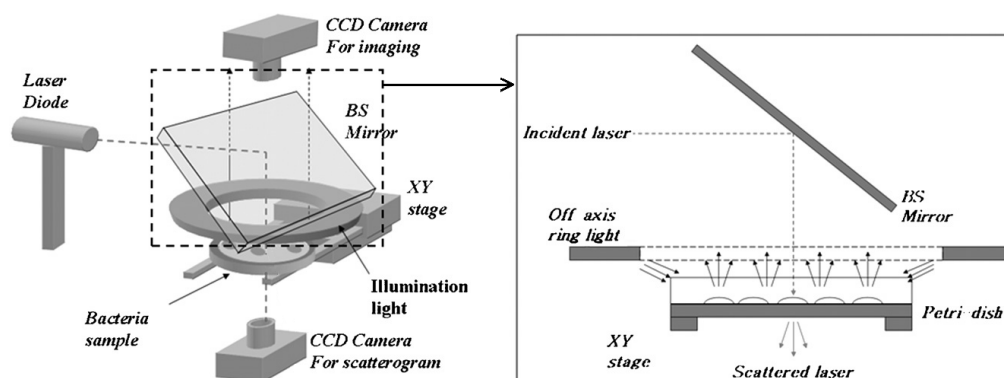


Figure 1.5 – Schéma extrait de [Bae et al., 2009] expliquant le principe d'une méthode basée sur l'étude des figures de diffusion des colonies.

Le Tab.1.1 résume les familles de techniques issues de l'état de l'art pour détecter des colonies qui se développent à la surface d'un milieu de culture. Afin de s'affranchir des problèmes liés au contraste et pour gagner en robustesse afin de créer un système de détection universel, nous nous sommes tournés vers une famille de techniques qui se développe depuis quelques dizaines d'années : la mesure tridimensionnelle. Nous nous sommes intéressés en particulier aux méthodes d'inspection de surface. En effet, s'il est possible d'obtenir une représentation précise de la surface, nous pourrions y détecter les formes correspondant aux colonies. Ces méthodes sont discutées dans la partie suivante.

Méthode	Avantages	Inconvénients
Image classique	Simplicité	Contraste faible Dépendant du micro-organisme
Image en fluorescence	Bon contraste Indépendant du micro-organisme	Nécessite l'ajout de réactifs
Diffusion et diffraction	Permet d'identifier certains micro-organismes	Repose sur une base d'apprentissage Ne fonctionne pas avec une membrane Mise en œuvre complexe
Mesure 3D	Indépendant du contraste Indépendant du micro-organisme	Mise en œuvre complexe

Table 1.1 – Résumé des principales méthodes de détection de micro-organismes.

1.2 Méthodes de mesure tridimensionnelle

Dans le cadre de la détection précoce de colonies, nous nous intéressons à des objets de quelques dizaines de micromètres. Nous dressons donc ici une étude des méthodes de mesures de surface capables d'acquies de tels objets. Les plus anciennes méthodes sont les mesures par contact, où un stylet vient par exemple au contact de la surface en chaque point à mesurer et permet d'en

dresser une topographie. Ces méthodes ne peuvent être utilisées pour le test de stérilité car nous ne pouvons pas accéder à la surface directement, au risque de contaminer l'échantillon.

Pour la même raison, nous écartons les microscopes à sonde locale (microscope à force atomique, microscope à effet tunnel et microscope optique en champ proche). De plus, ces méthodes ne sont pas adaptées à l'échelle que nous souhaitons mesurer car elles permettent de mesurer des objets très petits, en dessous de 500 nm jusqu'à quelques nm, mais sont de ce fait limitées à des petites surfaces.

Il existe de nombreuses méthodes qui permettent une mesure 3D sans contact, en se basant sur la réflexion ou la transmission d'un signal par l'objet à mesurer. Le signal peut être une onde acoustique ou électromagnétique, mais la majorité de celles qui nous intéressent sont basées sur des moyens de mesure optiques. Sansoni *et al.* [2009] dressent une revue de ces méthodes, décrites Figs.1.6 à 1.11.

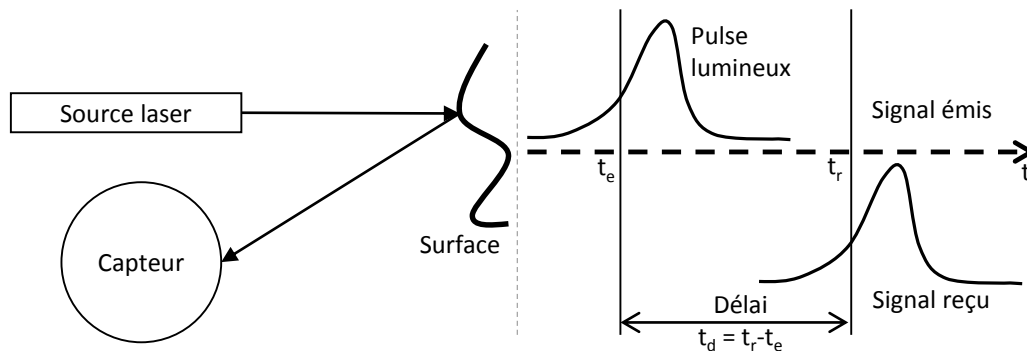


Figure 1.6 – Délai Connaissant la vitesse de la lumière, il est possible (principe du sonar) d'envoyer un pulse lumineux (avec un laser) et de mesurer le temps t_d que celui-ci met à revenir au capteur. Comme ce temps est proportionnel à la distance parcourue, nous pouvons en déduire la mesure relative de la hauteur entre la sonde et un point de la surface considérée. En parcourant cette dernière entièrement, nous obtenons sa topographie complète.

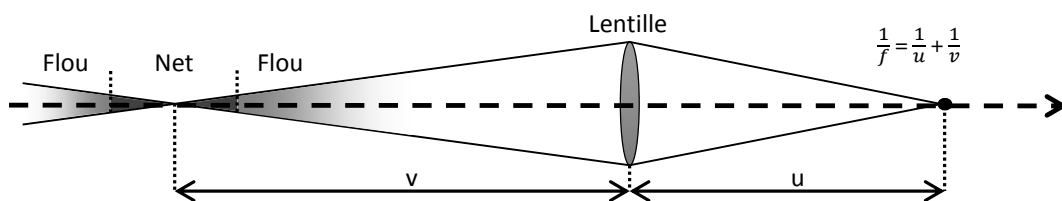


Figure 1.7 – Flou Le flou en un point d'une image est proportionnel à la distance entre le point correspondant de la surface et un plan de cette même surface qui est net dans l'image. Plusieurs images de la surface prises pour différentes distances focales (f) peuvent donc être utilisées afin d'en déduire la topographie de la surface en analysant le flou. La méthode active consiste à projeter un motif sur la surface et à mesurer le flou de ce motif. Pour la méthode passive, le flou de l'image est utilisé en s'appuyant sur la texture de la surface. Cette méthode est la base de l'imagerie confocale.

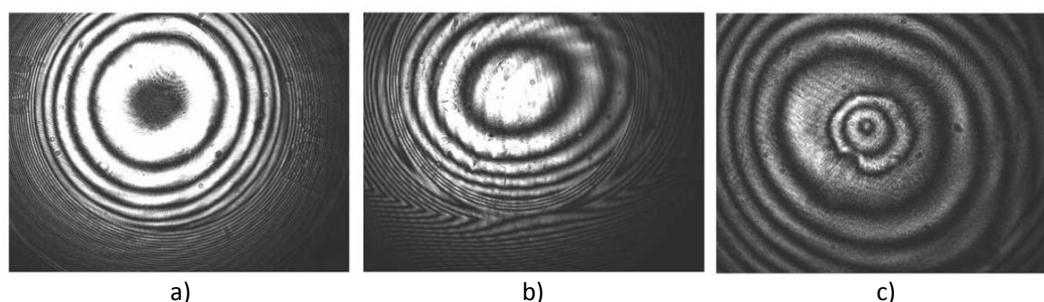


Figure 1.8 – Interférométrie et Moiré Un dispositif dont la figure d'interférence théorique est connue est utilisé. La surface à mesurer est placée dans le système. Ceci induit une déformation de la figure qui est liée à la topographie de la surface. Cela permet donc de la mesurer. Trois interférogrammes issus de [Acosta *et al.*, 2006] sont présentés ici. Les franges d'interférence montrent les formes de lentilles de contact à sphère positive (a), torique (b) et après une exposition à l'air(c). Ce principe peut aussi être appliqué en se basant sur l'analyse de figure de Moiré éventuellement combinée à l'utilisation des relations de triangulation.

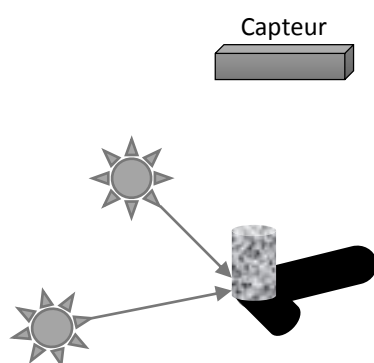


Figure 1.9 – Ombres En réalisant plusieurs acquisitions d'une même surface tout en faisant varier la direction de l'éclairage, différentes ombres correspondant à des profils de la surface peuvent être obtenues. À partir de ces ombres, et connaissant la position des sources d'éclairage utilisées, les distances dans l'image peuvent être évaluées et les déformations mesurées. Plus la surface est lisse et plus les positions d'éclairage sont choisies proches du plan de celle-ci, afin de maximiser la taille des ombres et donc la résolution du système.

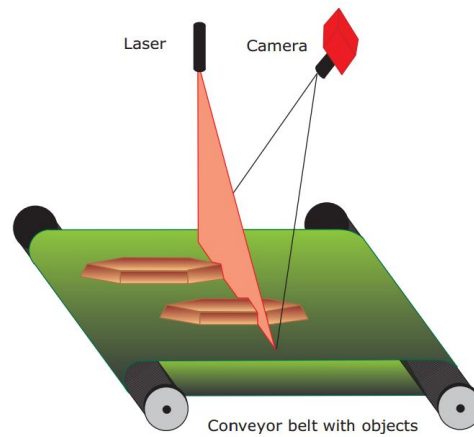


Figure 1.10 – Triangulation laser Un laser peut être utilisé pour projeter un point ou une ligne sur la surface. Un capteur observe la scène sous un angle différent et en mesurant la position de l'image du point (ou de la ligne) sur le capteur, sa hauteur peut être déduite. En balayant toute la surface, sa topographie complète est reconstruite.

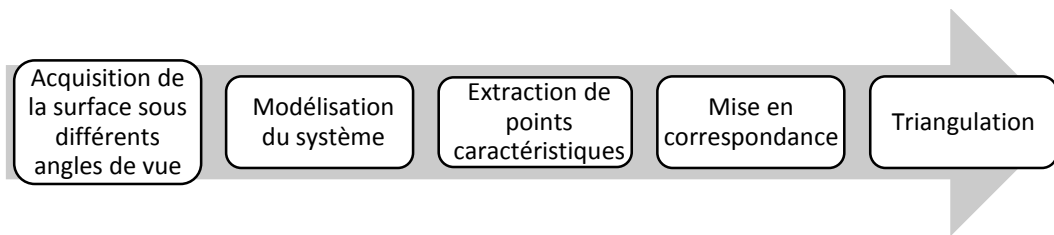


Figure 1.11 – Stéréo-vision et photogrammétrie En s'inspirant de l'être humain qui perçoit la profondeur grâce à sa vision binoculaire, plusieurs acquisitions de la surface sont réalisées sous différents angles de vue. Des points particuliers de la scène et qui sont présents dans les différentes images sont utilisés pour estimer la topographie recherchée suivant la procédure décrite.



Figure 1.12 – Projection de lumière structurée Si un motif connu est projeté sur une surface (a), et que celle-ci est imagée sous cet éclairage, les déformations du motif correspondent à la topographie de la surface. Le motif projeté peut être un nuage de points, des bandes, un damier, des cercles, etc. et permet d'acquérir la totalité de la surface en une seule fois. La méthode la plus utilisée consiste à projeter des franges, ce qui donne après post-traitement, l'image (b) extraite de [Scharstein et Szeliski, 2003].

1.3 Choix de la triangulation

En se basant sur l'analyse de Sansoni *et al.* [2009], les moyens de mesure qui requièrent une puissance de calcul importante peuvent être éliminés, comme ceux basés sur la projection de lumière structurée (Fig.1.12), la stéréo-vision ou la photogrammétrie (Fig.1.11). Il en est de même pour les méthodes offrant de faibles performances en terme de précision comme la modélisation basée sur l'étude de l'ombre de la surface (Fig.1.9). Les méthodes basées sur la détection de focus (Fig.1.7) offrent le plus souvent de faibles profondeurs de champ ou de faibles distances de travail qui sont un obstacle suffisant pour ne pas les considérer plus en avant. Les méthodes utilisant des structures moirées pour réaliser la mesure ne sont performantes que pour des surfaces suffisamment lisses, ce qui ne sera pas toujours le cas. Enfin, les mesures basées sur l'interférométrie (Fig.1.8) étant très sensibles aux perturbations de l'environnement, elles sont difficiles à mettre en œuvre dans un système de test de stérilité.

Deux catégories de méthodes semblent donc convenir à notre application, la première basée sur la triangulation laser (Fig.1.10) et la seconde basée sur la mesure du temps de parcours d'une onde (lumineuse par exemple - Fig.1.6), à condition d'avoir un capteur rapide. Ces méthodes offrent des performances comparables en terme de vitesse d'acquisition ou de robustesse par rapport à l'éclairage ambiant. Si celles basées sur la triangulation sont un peu plus limitées quand à l'échelle de mesure, elles permettent d'atteindre de meilleures résolutions, ce qui nous conduit à préférer la triangulation pour notre application.

Costa [2012] propose un historique de la mesure 3D optique et s'intéresse plus particulièrement à la triangulation. Depuis son apparition dans les années 80, cette technique a été employée dans de nombreuses applications et des solutions ont été proposées pour repousser ses limites, en s'appuyant par exemple sur l'évolution des capteurs. Le laser a toujours été préféré pour cette mesure car il offre un rayon lumineux puissant et facile à collimater en un point, une ligne ou un réseau de points ou de lignes. Il a cependant ses limites, liées au fait qu'il émet une lumière cohérente responsable de la formation de bruit de chatoiement (*speckle* en anglais) dans l'image. Ce bruit multiplicatif est difficile à traiter et est la principale source d'incertitude dans la mesure de hauteur [Baribeau et Rioux, 1991; Leach, 2011]. Dans le cas de mesure par projection laser, des méthodes optiques sont souvent utilisées pour réduire le *speckle* [Craggs *et al.*, 2012]. Ce bruit est également présent dans d'autres domaines où des algorithmes ont été développés pour en diminuer l'influence. Les images ultrasonores comme l'écographie, les images acquises par tomographie en cohérence optique ou les images radar présentent par exemple également du *speckle*. Dans ces domaines, il est réduit de manière algorithmique [Rekha *et al.*, 2015; Darlow *et al.*, 2015; Argenti *et al.*, 2013].

Un système classique de triangulation est décrit Fig.1.13. La base de cette méthode est l'angle $\phi = \alpha + \beta$ entre l'axe optique du dispositif d'éclairage et l'axe optique du capteur, appelé angle de triangulation. C'est cette différence de point de vue qui crée le décalage permettant de voir le relief. Ce décalage est observé sur le capteur (y') et est proportionnel à la hauteur ayant créé le décalage, Z . La relation entre les deux est donnée par l'Eq.1.1. Le détail du calcul est donné

en annexe (Ann.A).

$$Z = \frac{y' f \cos(\beta)}{f' \sin(\alpha + \beta) - y' \cos(\alpha + \beta)} \quad (1.1)$$

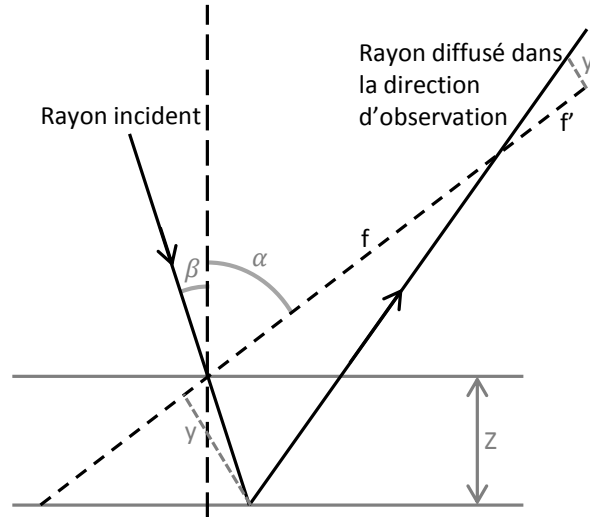


Figure 1.13 – Description d'un système de triangulation montrant le parcours du rayon incident et l'angle de triangulation $\phi = \alpha + \beta$. Le schéma est inspiré de Costa [2012].

À partir de l'équation de la hauteur, nous pouvons montrer que la résolution (Eq.1.2) du système dépend principalement de l'angle ϕ . $M = \frac{f'}{f}$ est une caractéristique du système dont la valeur peut être estimée par étalonnage. Lorsque l'angle augmente, la résolution augmente. Un angle trop grand implique cependant une moins bonne robustesse de la mesure puisque la quantité de lumière reçue par le capteur est réduite et que le risque de créer des zones d'ombre est augmenté. Il est donc nécessaire de trouver un bon équilibre entre les deux, qui se trouve généralement dans la zone d'inflexion de la courbe présentée Fig.1.14, qui montre l'évolution de la résolution en Z en fonction de l'angle de triangulation choisi. Ce calcul est également détaillé en annexe (Ann.A).

$$\Delta Z = \Delta y' M \frac{\cos(\beta)}{\sin(\alpha + \beta)} \quad (1.2)$$

1.4 Choix des éléments

Pour faire l'acquisition d'une surface, il est plus performant d'utiliser un système de triangulation à ligne plutôt qu'un point. Cela permet de gagner du temps lors du balayage de la surface. Nous avons commencé par tester un dispositif intégrant à la fois le générateur de ligne et le capteur. Le choix s'est porté sur le système Keyence LJ-V7060, utilisant un laser bleu (405 nm). En 2012, c'était le seul fabricant à proposer un tel capteur avec cette longueur d'onde.

Cela a son importance car les membranes généralement utilisées pour le test de stérilité n'ont pas une réponse homogène en fonction de la longueur d'onde. Si le premier type de membrane, en ester de cellulose, ne pose généralement pas problème, le second type de membrane, en PVDF,

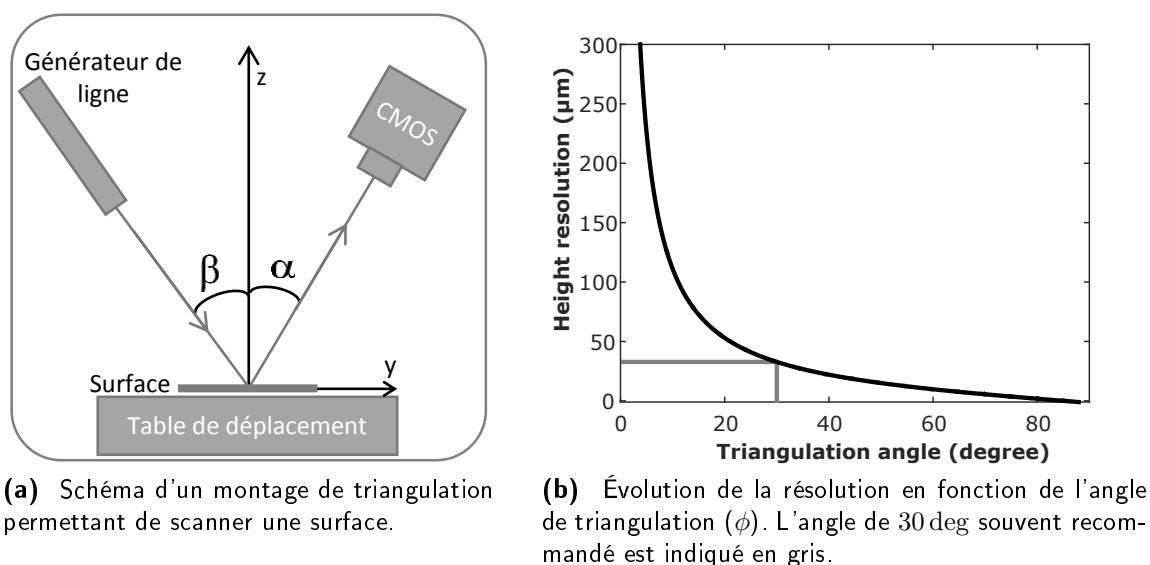


Figure 1.14 – La triangulation : schéma et résolution.

devient transparent lorsqu'il est humide. Les dispositifs émettant dans des longueurs d'onde moins énergétiques comme le rouge ont tendance à passer à travers le matériau, ce qui empêche la mesure (voir Fig.1.15). Ces longueurs d'onde produisent également des résultats plus bruités.

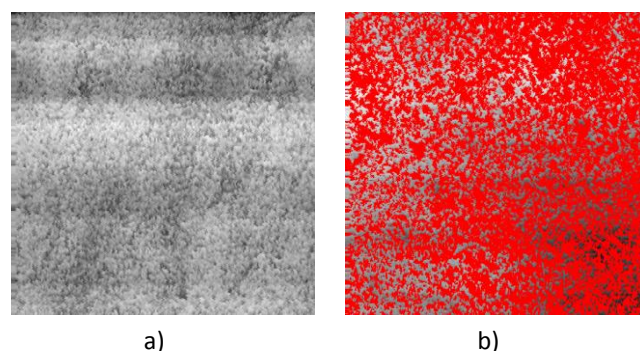


Figure 1.15 – Membrane en PVDF scannée par un dispositif à longueur d'onde rouge. La hauteur mesurée est représentée en niveaux de gris et les points rouges correspondent aux points non mesurables. (a) membrane en cellulose et (b) membrane en PVDF.

Le capteur Keyence nous a permis de montrer que la triangulation est une méthode adaptée à la détection de colonies de micro-organismes sur une surface. Il est cependant limité par le fait qu'un certain nombre d'informations ou de réglages sont inaccessibles. Par exemple, les données brutes acquises (*raw data*) ne sont pas accessibles directement, il est uniquement possible de les visualiser. De plus, des post-traitements sont appliqués sur ces données sans être documentés (par exemple le fait que le capteur comporte 640 pixels dans sa longueur, mais les données en sortie donnent une ligne qui comporte 800 pixels). Ces constatations ainsi que le coût élevé de cette solution nous ont conduit à envisager de construire nous même le dispositif de triangulation, en choisissant un capteur d'une part, et un générateur de ligne d'autre part.

Puisque nous souhaitons extraire la hauteur de la scène à partir des données, nous avons cherché une caméra intégrant cette fonctionnalité. Parmi ces caméras, nous avons choisi celle qui permet d'atteindre les plus hautes fréquences d'acquisition pour pouvoir parcourir la membrane le plus rapidement possible. Notre choix s'est donc porté sur le modèle Photonfocus MV1-D2048x1088-3D03-760-G2 [Photonfocus, 2014]. Cette caméra peut fonctionner en mode 3D ou en mode 2D, ce qui permet d'acquérir en plus des profils, une image en niveaux de gris de la zone scannée.

Pour extraire la hauteur à partir de l'image, la caméra suit le processus expliqué Fig.1.16. La caméra fait l'acquisition d'images 2D en niveaux de gris (a). L'image représente la surface avec la ligne projetée dessus. En déplaçant l'objet entre chaque acquisition, toute sa surface est parcourue et un ensemble d'images 2D est ainsi constitué (b). Pour chaque image, l'algorithme cherche à localiser la ligne. Il procède pour cela colonne par colonne. Pour chaque colonne, il localise le pixel correspondant au maximum d'intensité (c). La concaténation des résultats obtenus sur toutes les colonnes de l'image donne un profil (d). Si tous les profils de toutes les images sont à leur tour concaténés (e), la topographie complète de la surface scannée est reconstituée (f). Dans la pratique, la conversion se fait en temps réel à chaque image acquise, et la mesure est réalisée dynamiquement, au cours du déplacement de la surface. La méthode de détection du maximum dans la colonne repose sur la modélisation du signal de cette colonne par une forme gaussienne. La position du maxima est ensuite estimée en utilisant les paramètres de cette gaussienne.

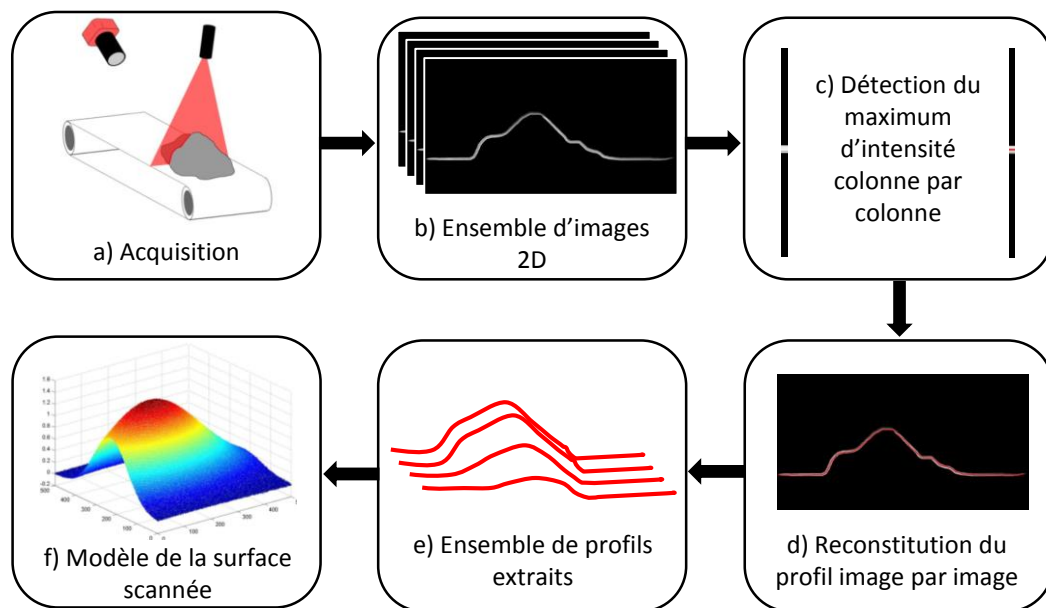


Figure 1.16 – Caméra Photonfocus : processus d'estimation de la hauteur à partir de l'image.

Le CMOS de la caméra a une largeur (l) de 11.26 mm comportant 2048 pixels (dans sa hauteur, il compte 1088 pixels). Nous souhaitons obtenir une résolution de $20 \mu\text{m}$ dans cette direction, ce qui donnerait un champ de vision (c) d'environ 41 mm. En utilisant la relation $G = \frac{l}{c}$, nous choisissons d'adapter une optique de grossissement $G = 0.28$ sur la caméra. L'optique choisie est la Pentax C5028A-M035 dont la focale est de 50 mm.

Pour être robuste à un mauvais positionnement de la surface et aux déformations de celle-ci,

nous souhaitons disposer d'au moins 5 mm de profondeur de champ. Cela nous permet d'atteindre une fréquence d'acquisition de 1380 fps en masquant une partie du CMOS qui se trouve réduit à 256 pixels dans sa hauteur. Afin que la profondeur de champ de l'optique soit suffisante, nous choisissons une ouverture de f/8, ce qui donne une profondeur de champ mesurée à 6.8 mm. La relation entre l'ouverture et la profondeur de champ est détaillée en annexe (Ann.B). Par ailleurs, le constructeur de la caméra recommande d'utiliser un angle de 30 degrés pour la triangulation. La distance de travail de la caméra est de 200 mm. Le Tab.1.2 récapitule toutes ces informations et la Fig.1.17 montre le système de triangulation ainsi élaboré.

Résolution dans l'axe de la ligne	20 μm
Champ de vision	41 mm
Grossissement	0.28
Fréquence d'acquisition	1380 fps
Ouverture	f/8
Angle de triangulation	30 degrés
Distance de travail	200 mm

Table 1.2 – Résumé des différents paramètres choisis pour les réglages du système.



Figure 1.17 – Premier prototype d'acquisition équipé de la caméra Photonfocus choisie.

Conclusion Dans ce chapitre, nous avons conçu un dispositif d'acquisition topographique basé sur la triangulation, capable de détecter des colonies de micro-organismes et répondant aux contraintes liées au test de stérilité. Il reste cependant un élément du dispositif à choisir, qui est à la base du système : le dispositif générateur de ligne. C'est l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2

Comparaison LED/laser

Introduction Afin de choisir le dispositif générateur de ligne le plus adapté à l'application de test de stérilité, nous nous proposons d'étudier différents modèles. Dans un premier temps, nous décrivons deux façons de générer une ligne (Sect.2.1). Nous comparons ensuite les lignes ainsi créées (Sect.2.2) puis nous réalisons des acquisitions dans différentes conditions afin d'évaluer les performances des différentes lignes (Sect.2.3 et Sect.2.4).

2.1 Génération de ligne

Nous avons identifié deux types de générateurs de ligne. Le premier, le plus classique, à laser et le second à LED. La lumière laser a de nombreux avantages pour la génération d'une ligne du fait qu'elle est cohérente. Il est donc plus facile de focaliser son rayon pour créer la forme souhaitée. Les lasers émettent par ailleurs une lumière puissante et il existe aujourd'hui des générateurs compacts qui sont faciles à intégrer dans un dispositif de mesure. Le principal inconvénient du laser est le *speckle*, bruit multiplicatif qui crée une incertitude sur la mesure [Leach, 2011]. Depuis quelques années, des LEDs de forte puissance sont apparues sur le marché, ouvrant aux dispositifs à LEDs de nouveaux champs d'application en concurrence du laser. Si elles conservent les inconvénients de leur éclairage diffus, il est possible de les focaliser suffisamment sans perdre trop de puissance. Ce type d'éclairage ne produit pas de *speckle* mais est un peu plus encombrant car il faut dissiper la chaleur produite par les LEDs.

Pour générer une ligne lumineuse à partir d'un faisceau laser, il est possible d'utiliser par exemple une lentille cylindrique ou une lentille de Powell. C'est cette dernière qui est utilisée dans le laser que nous avons testé et dont le schéma est présenté Fig.2.1a. Cela permet de rediriger le faisceau lumineux vers la ligne en limitant les pertes. La majorité de la puissance lumineuse émise par le laser est ainsi redirigée. Dans le cas de la LED, la lumière émise (généralement par plusieurs LEDs) doit d'abord être concentrée avant d'utiliser une fente pour former la ligne (Fig.2.1b).

Afin de proposer deux équipements ayant des coûts similaires, nous avons choisi les lignes laser Z-laser (série ZM18H) et LED Effilux (série Effi-lase power). Que ce soit pour le laser ou pour la LED, différentes longueurs d'onde sont proposées par les constructeurs. Nous savons déjà que le rouge n'est pas la meilleure option, nous avons donc testé les longueurs d'ondes restantes, présentées dans le Tab.2.1.

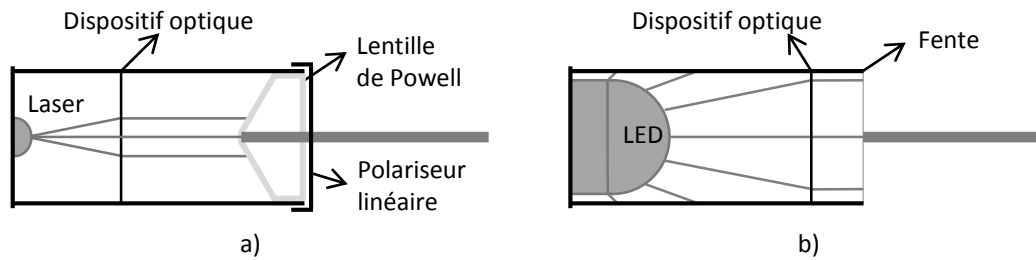


Figure 2.1 – Systèmes optiques de génération de ligne utilisant un laser (a) ou une LED (b).

Couleur	Longueur d'onde laser	Longueur d'onde LED
Vert	532 <i>nm</i>	525 <i>nm</i>
Bleu	450 <i>nm</i>	465 <i>nm</i>
UV	404 <i>nm</i>	405 <i>nm</i>

Table 2.1 – Longueurs d'onde disponibles.

Nous avons constaté que le vert donne également des résultats bruités et ne permet pas de lire la membrane HV. Pour les deux longueurs d'ondes restantes, des acquisitions ont été réalisées pour les deux types de membrane et en faisant varier la vitesse de déplacement (Tab.2.2). La longueur d'onde 450 *nm* donne des résultats moins bruités en dynamique. De plus, le bruit augmente avec la vitesse, et le fait de se déplacer a un gros impact sur celui-ci. Ceci est lié au speckle qui est généré par les micro-textures de la surface de la membrane lorsque celle-ci se déplace.

Dans la suite du chapitre, nous comparons les performances de ces deux lignes dans le cadre de la triangulation pour l'application de test de stérilité. Nous nous concentrons donc sur la longueur d'onde 450 *nm* pour le laser. Pour la LED, nous avons choisi directement la longueur d'onde la plus proche, 465 *nm*. Nous avons testé plusieurs dispositifs avec des largeurs de masque différentes (10, 20 et 50 μm). Plus cette largeur est petite, plus la ligne générée est fine, permettant de détecter des objets plus petits. Cependant, la perte de puissance est aussi plus importante avec une ligne fine. Nous avons donc sélectionné le masque donnant la ligne la plus large. Nous disposons du même levier avec le laser, mais comme ce dispositif est puissant, nous pouvons privilégier la finesse de la ligne. Nous avons donc choisi le modèle avec une lentille de Powell dont

Membrane	Longueur d'onde	0 <i>mm/s</i>	10 <i>mm/s</i>	27.6 <i>mm/s</i>
HA	404 <i>nm</i>	3.91	26.32	28.89
	450 <i>nm</i>	3.02	16.09	24.75
HV	404 <i>nm</i>	4.12	33.85	46.97
	450 <i>nm</i>	4.70	28.91	41.26

Table 2.2 – Bruit mesuré en fonction de la vitesse de translation, du type de membrane et de la longueur d'onde du laser. Les valeurs données correspondent à l'écart-type évalué sur les données de hauteur acquises en dynamique.

l'angle est de 10 degrés.

Les paramètres utilisés pour la suite sont donnés en annexe (Ann.C). Seuls deux d'entre eux sont adaptés lors du passage de la LED au laser. Le temps d'exposition est ajusté respectivement de 700 μs à 300 μs . Pour le laser, nous utilisons un mode de la caméra (*High Dynamic Range*) qui permet d'adapter la dynamique du capteur et donc de limiter la saturation.

2.2 Ligne

Dans cette partie, les deux lignes sont analysées séparément afin de les comparer. Le profil de la ligne est étudié en premier. Ce profil correspond à la distribution de la lumière émise par la ligne selon un axe perpendiculaire à l'axe de celle-ci. C'est selon cet axe qu'est faite la détection de maximum qui mène à l'estimation de la hauteur. Or nous avons vu que cette détection est basée sur un modèle de forme gaussienne. Nous cherchons donc à connaître le profil des deux lignes et à voir lequel est le plus proche d'une gaussienne. Cela permettrait en effet de diminuer l'erreur d'estimation de la position du maximum. Dans un second temps, nous nous intéressons à la distribution de la lumière le long de la ligne. Si celle-ci est homogène, la mesure est faite dans les mêmes conditions qu'elle soit prise au milieu de la ligne ou à une extrémité.

2.2.1 Mesures du profil de la ligne

En observant les images des lignes sur le CMOS de la caméra, Fig.2.2, nous constatons l'effet du *speckle* sur l'homogénéité de la ligne laser. Celle-ci est également plus longue, permettant ainsi de scanner une plus grande surface. Les réglages de la caméra, en particulier le temps d'intégration, sont adaptés à chaque ligne, aussi la saturation n'est atteinte pour aucun pixel.

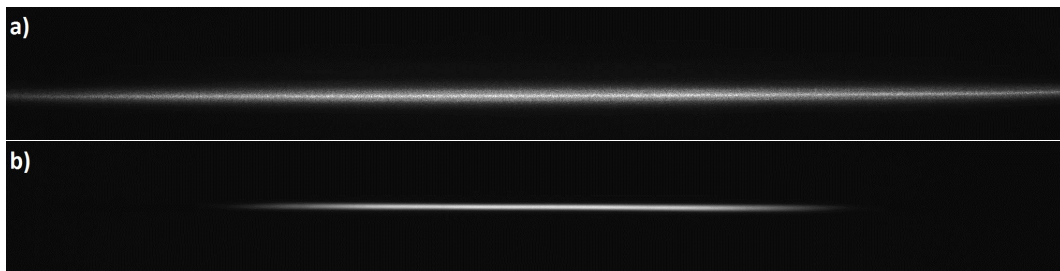


Figure 2.2 – Image des lignes laser (a) et LED (b) sur le CMOS, représentées à la même échelle.

À partir d'images des deux lignes, il est possible d'observer leurs profils respectifs (Fig.2.3). Celui du laser montre bien une allure proche d'une gaussienne, mais de nombreux pics secondaires sont présents à cause du *speckle*. Le profil de la ligne générée par des LEDs montre au contraire un profil très lisse et gaussien, qui est donc mieux adapté à la mesure de hauteur. Par ailleurs, comme nous l'indique la FWHM (Fig.2.3), la ligne laser est deux fois plus large, ce qui rend la localisation du maximum moins précise. Cela peut empêcher la détection des plus petits objets, puisque des objets de taille inférieure à la largeur de la ligne ne pourront être résolus. Dans les deux cas, le pic s'étale sur toute la plage de valeur du capteur (qui va de 0 à 255) tout en conservant une marge garantissant de ne pas saturer le capteur.

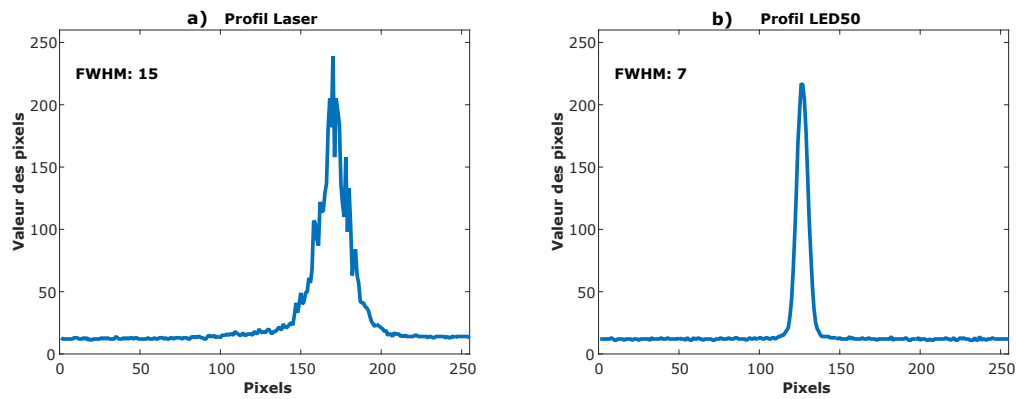
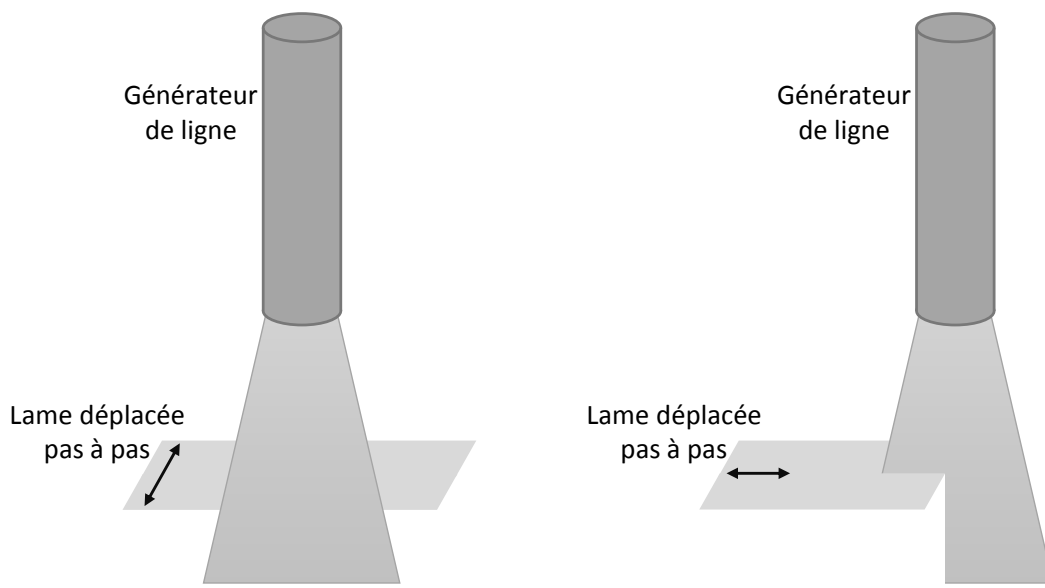


Figure 2.3 – Profil des lignes laser (a) et LED (b).

Afin de confirmer ces premières mesures, nous avons mis en place une expérience dite du couteau, qui consiste à déplacer pas à pas une lame parallèle à la ligne, de manière à masquer progressivement toute la ligne, comme décrit Fig.2.4a. À chaque pas, la quantité de lumière reçue par une colonne de pixels de la caméra choisie au centre de la ligne est mesurée.



(a) Pour l'étude du profil de la ligne, la lame est déplacée perpendiculairement à l'axe de la ligne.

(b) Pour l'étude de l'homogénéité de la ligne, la lame est déplacée parallèlement à l'axe de la ligne.

Figure 2.4 – Dispositifs pour l'expérience du couteau.

Dans notre cas, la lame a été remplacée par une membrane HA déposée sur un support métallique. Nous restons ainsi dans des conditions proches de celles de l'application. L'épaisseur de la membrane est suffisamment faible pour simuler une lame et ne pas créer de distorsions à ce niveau. Le pas entre chaque acquisition est de $5 \mu\text{m}$. Afin de diminuer le bruit d'acquisition, nous moyennons dix acquisitions à chaque pas, et nous n'utilisons pas le résultat d'une seule colonne, mais une moyenne sur 50 colonnes de pixels.

Le résultat obtenu pour les deux lignes est présenté Fig.2.5. La forme générale du signal observé correspond à celle d'une gaussienne cumulée. L'acquisition avec la ligne laser présente, comme attendu, des irrégularités dues au speckle. Il est à nouveau possible de comparer l'épaisseur des lignes, et de confirmer que celle du laser est presque deux fois plus large que celle obtenue avec la LED.

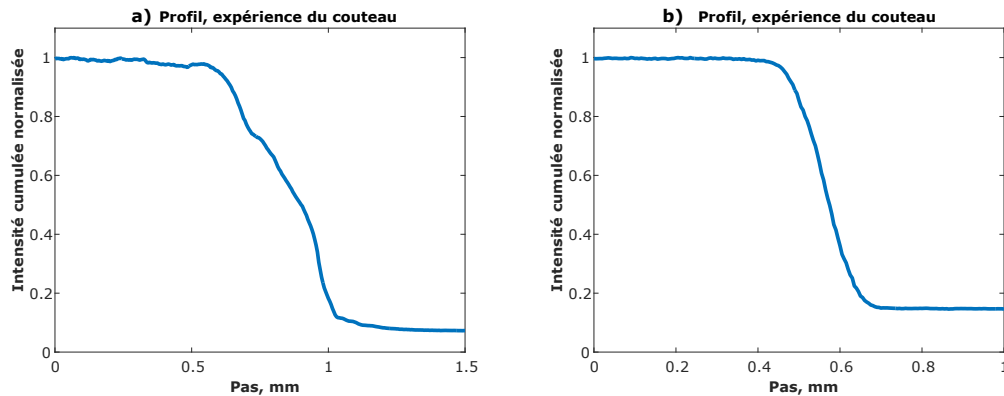


Figure 2.5 – Profils des lignes laser (a) et LED (b).

2.2.2 Mesure de la distribution de la lumière sur la ligne

Maintenant que nous connaissons le profil de la ligne, nous souhaitons nous intéresser à la distribution de la lumière le long de la ligne. Nous utilisons pour cela la même expérience du couteau, mais en changeant l'orientation de la lame, comme décrit Fig.2.4b. Le pas d'acquisition est toujours de $5 \mu m$, mais la lumière reçue est à présent sommée sur la totalité du capteur.

Les Figs.2.6a et b montrent les résultats de l'expérience du couteau, en représentant la quantité de lumière reçue par le capteur en fonction de la position de la lame. L'homogénéité des lignes est confirmée par leur linéarité dans la partie centrale, délimitée par les traits verticaux. Cela confirme la recommandation du constructeur qui est de privilégier cette partie pour la mesure, de manière à utiliser environ 80% de la longueur de la ligne. La ligne laser est cependant 1.8 fois plus longue pour le laser que pour la LED.

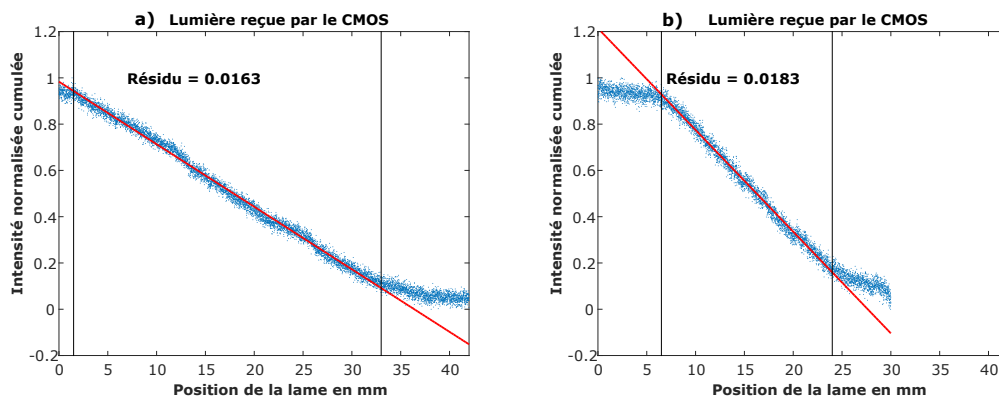


Figure 2.6 – Homogénéité des lignes laser (a) et LED (b). La zone d'intérêt (délimitée par les traits verticaux) de la ligne laser mesure 31.5 mm, celle de la LED 17.5 mm.

2.3 Acquisitions sur membrane seule

Nous connaissons à présent les caractéristiques des deux lignes. Dans cette partie et dans la suite du chapitre, nous étudions le comportement des lignes et leur impact sur la mesure de hauteur. Puisque nous souhaitons mener ces tests dans des conditions les plus proches possibles de l'application de test de stérilité, commençons par observer les supports généralement utilisés, les membranes HA et HV.

Nous suivons le même procédé pour les deux lignes. Pour réduire les bruits qui peuvent s'ajouter à la mesure, nous avons choisi de faire une acquisition statique : la membrane est placée dans le système et est parcourue pas à pas. C'est la seule différence par rapport aux conditions de l'application puisque pour un test de stérilité, l'acquisition est faite de manière dynamique. Ce procédé permet de s'affranchir de bruits provenant d'éventuelles vibrations lors du mouvement. Cela permet également de faire plusieurs acquisitions (1900) à chaque pas et de moyenniser celles-ci afin de réduire le bruit lié au capteur. Les paramètres de la caméra sont les mêmes que ceux utilisés précédemment. Comme la mesure est réalisée pas à pas, elle prend beaucoup de temps (quelques heures). La membrane n'est donc pas déposée sur un milieu de culture car cela impliquerait des changements entre le début et la fin de l'acquisition à cause de l'évaporation de ce milieu. Les tests sont donc faits sur membrane sèche.

Une fois la mesure terminée, les profils moyens sont récupérés afin de reconstruire la topographie de la surface scannée en les concaténant. Un pré-traitement est appliqué aux données. Il consiste 1) à calculer et à soustraire la moyenne ligne par ligne puis colonne par colonne, afin de supprimer les artefacts dûs aux vibrations de l'environnement ; 2) à aplatir la surface en utilisant une régression polynomiale du second degré à deux dimensions. Cela compense les erreurs d'horizontalité du positionnement ou les grandes déformations de la membrane ; 3) à appliquer un filtre médian de taille 3x3 pour supprimer d'éventuelles données aberrantes. Les résultats sont présentés Fig.2.7. Dans le cas du laser, le bruit est très important, aussi, un filtrage classique basé sur la méthode de Lee [Lee, 1980] est ajouté.

Le filtrage de Lee permet de réduire le bruit d'un rapport 3 au moins, donnant un résultat proche des acquisition avec la LED, ceci quelle que soit la membrane. Les résultats du laser filtré et de la LED montrent les structures correspondant au relief de la membrane, même si la topographie est plus visible dans le cas de la LED que dans celui du laser. La variabilité entre les deux membranes est plutôt faible, ce qui s'explique par le fait que les acquisitions sont faites sur des membranes sèches. La mesure de l'écart-type des hauteurs pour la membrane HA est de plus biaisée par le relief de cette membrane, ce qui n'est pas le cas de la membrane HV, qui est beaucoup moins déformée. Ce comportement est lié aux matériaux composant les membranes, l'ester de cellulose étant plus marqué par les contraintes (lors de la filtration par exemple) que le PVDF.

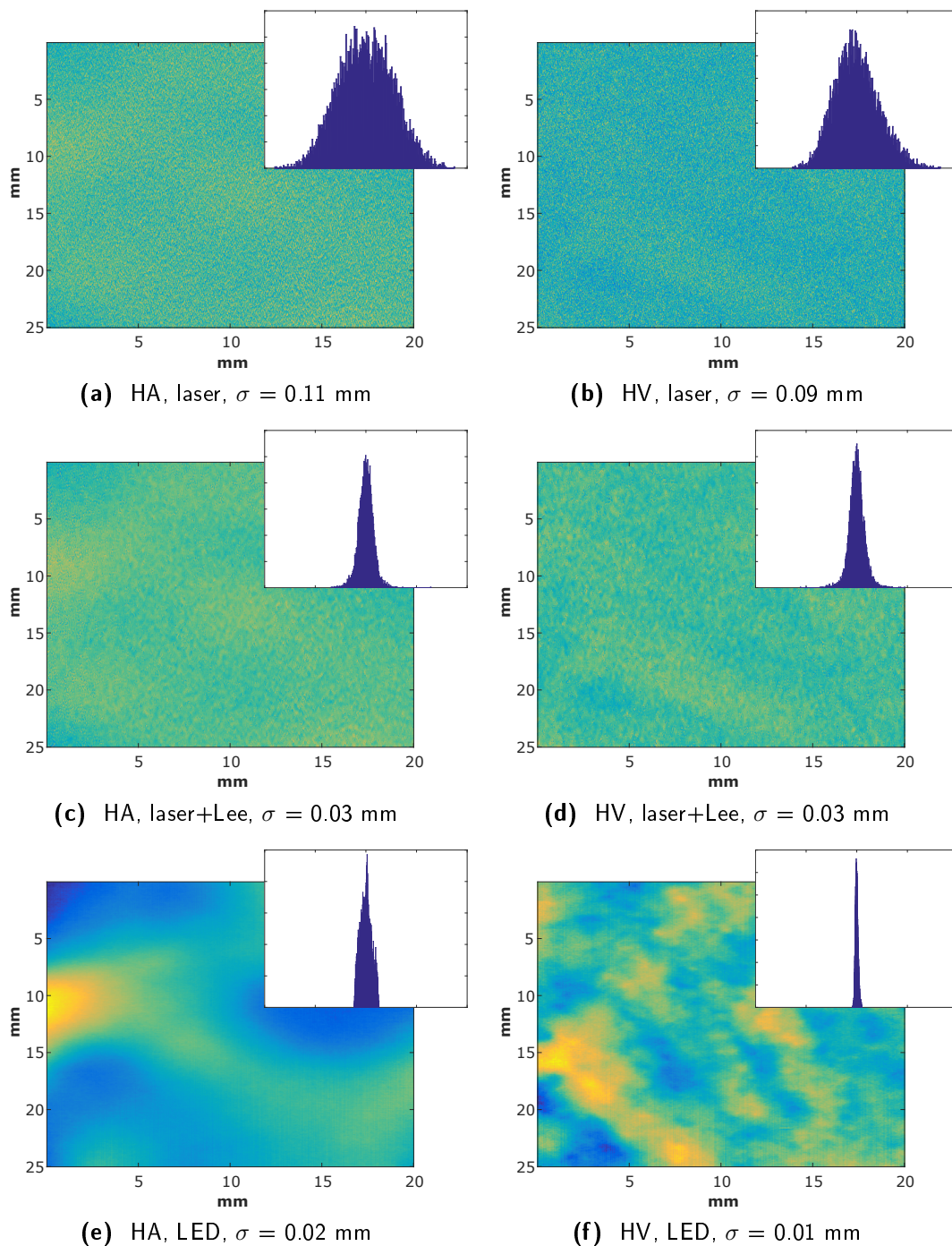


Figure 2.7 – Acquisitions sur les membranes HA et HV avec le laser, le laser avec un filtrage de Lee et la LED. Les images sont mises à la même échelle ([0 1]). En encart, les histogrammes (tous représentés selon le même axe des abscisses) et les valeurs d'écart type (σ) calculés pour une fenêtre de 100x100 pixels prise au centre de l'image.

2.4 Acquisitions sur membrane en présence d'objets

À présent que nous connaissons les caractéristiques statistiques des données de hauteur correspondant à l'acquisition des surfaces, examinons les capacités de détection du système. Des tests sont d'abord réalisés sur des objets puis sur des données réelles : des colonies de micro-organismes. Les données laser sont systématiquement filtrées grâce à la méthode de Lee [Lee, 1980].

2.4.1 Acquisitions sur membrane avec micro-sphères

Nous utilisons des micro-sphères en polystyrène de diamètre calibré décrites dans le Tab.2.3. Les micro-sphères n'ont pas les mêmes propriétés que les colonies de micro-organismes : leur forme est sphérique alors que la forme d'une colonie est proche d'une gaussienne bidimensionnelle. Leur texture est probablement aussi différente, les unes étant faites d'un matériau inorganique et les autres constituées de multitudes de micro-organismes vivants. La sphère est cependant l'objet calibré disponible sur le marché le plus proche.

D_{MS} (en μm)	D_{moy} (en μm)	σ (en μm)	pas (en μm)
50	52.55	5.09	20
75	75.86	11.58	20
100	98.31	8.27	50
250	255.20	27.50	50
500	530.10	46.39	50

Table 2.3 – Caractéristiques des micro-sphères et pas d'acquisition utilisés lors de l'acquisition. Le diamètre moyen (D_{moy}) et l'écart type (σ) fournis par le constructeur Phosphorex pour le lot utilisé sont donnés pour chaque taille de micro-sphère théorique (D_{MS}).

Pour les déposer sur les membranes, nous nous basons sur la procédure utilisée pour le test de stérilité. Les micro-sphères sont ajoutées à une solution d'eau stérile qui est ensuite filtrée à travers la membrane. Cette dernière retient les micro-sphères. La membrane est mise à l'air libre quelques heures pour sécher puis mesurée pas à pas en suivant la même méthode que pour l'étude des surfaces seules (Part.2.3). Le pas d'acquisition est adapté en fonction de la taille des micro-sphères. Dans le cas des micro-sphères de diamètre 500 μm , la partie des pré-traitements qui consiste à retravailler l'image colonne par colonne et ligne par ligne est supprimée car les micro-sphères sont très grandes et les vibrations qui étaient ainsi corrigées sont donc négligeables.

Que ce soit avec une membrane HA ou une membrane HV, la résolution obtenue avec la ligne LED ne permet pas de voir les micro-sphères de diamètre 50 μm , mais est capable de voir à partir de 75 μm (voir Fig.2.8). Cependant, dans ces conditions, le signal correspondant à une micro-sphère est particulier. Il est constitué de deux parties semblables, composées l'une d'un pic positif et l'autre d'un pic négatif, quelle que soit la membrane : HA (Fig.2.8e) ou HV (Fig.2.8f). Cet artefact est lié à la géométrie de la sphère et à l'inclinaison de l'éclairage, qui créent des réflexions parasites et des zones d'ombre. Ces acquisitions n'ont été faites qu'avec la ligne LED car d'aussi petits objets ne sont pas visibles avec la ligne laser.

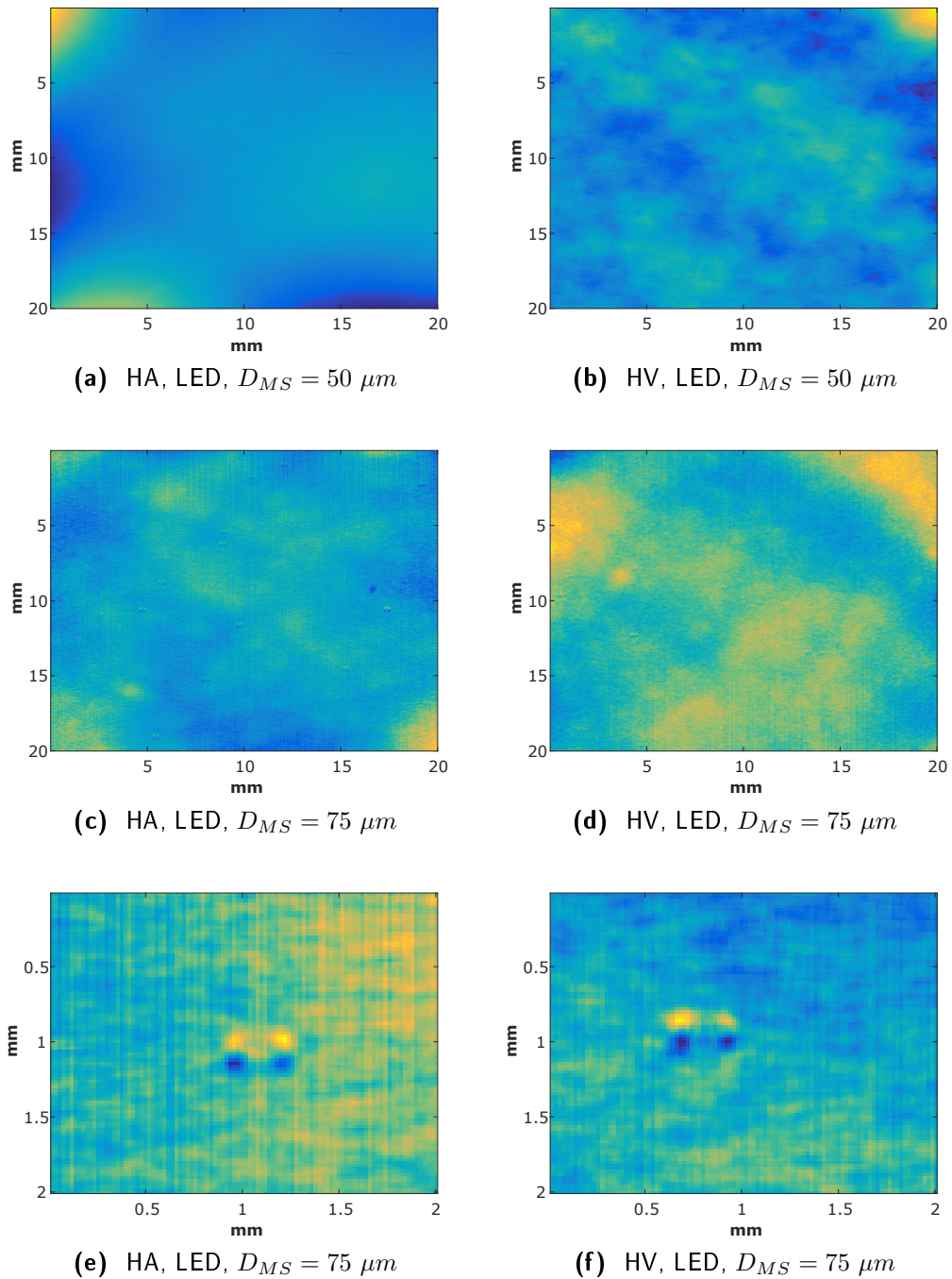


Figure 2.8 – Acquisitions sur membrane HA et HV pour des micro-sphères de taille 50 et 75 μm avec deux agrandissements centrés sur une micro-sphère. Les images sont mises à la même échelle.

Dans le cas de la membrane HA (Fig.2.9) comme dans celui de la membrane HV (Fig.2.10), le laser ne permet la détection d'objets qu'à partir de 250 μm . Mais même à cette taille, il est difficile de dire si les pics visibles correspondent à des micro-sphères ou à des artefacts. Dans le cas de la membrane HV, une comparaison peut être faite avec l'acquisition LED faite au même endroit. Dans le cas de la membrane HA, aucune micro-sphère ne correspond avec le signal. Comme les membranes sont déplacées entre les acquisitions, il est possible qu'une micro-sphère ait roulé, mais les autres ne sont pas du tout visibles sur la membrane. Il est donc vraisemblable que le signal observé pour la configuration laser et micro-sphères de diamètre 250 μm soit un artefact. Dans le cas des micro-sphères de 500 μm , elles sont parfaitement visibles dans toutes les configurations, même si certaines se sont déplacées.

Le Tab.2.4 récapitule ces résultats. La limite de détection pour les micro-sphères est de 75 μm dans le cas d'une ligne LED, et de 250 μm (on se place dans le cas favorable) sinon. Ces résultats peuvent être affinés en testant des sphères de diamètre intermédiaire. Néanmoins, l'intérêt de la ligne LED a été démontré ici dans le cas d'acquisitions sur des objets synthétiques. Dans l'expérience suivante, nous tentons de confirmer ces résultats avec des micro-organismes.

Taille	HA laser	HA LED	HV laser	HV LED
50 μm	na	-	na	-
75 μm	na	+	na	+
100 μm	-	+	-	+
250 μm	=	+	=	+
500 μm	+	+	+	+

Table 2.4 – Résumé des résultats observés avec les micro-sphères. Certaines acquisitions (na) n'ont pas été faites. Les scans où les colonies ne sont pas visibles sont repérés par -, ceux où elles sont visibles par + et les cas limites où elles commencent à apparaître par =.

2.4.2 Acquisitions sur membrane avec colonies

Pour tester les performances des lignes laser et LED dans les conditions du test de stérilité, nous avons réalisé des acquisitions sur des colonies de micro-organismes. Seule la membrane HV est testée ici car c'est la configuration la plus défavorable lorsque les membranes sont déposées sur gélose, donc humide (voir Sect.3.3). Nous avons choisi pour cela une levure, *Dekkera anomala*, dont les colonies présentent une forme gaussienne, représentative d'une majorité des cas, au moins au début de leur croissance. Elles sont de couleur blanche et ont un aspect mat. Cette espèce présente un temps de génération suffisamment long pour simplifier les conditions d'acquisition. En effet, les acquisitions laser et LED ne peuvent pas être réalisées en même temps, or une seule acquisition prend environ 4 heures. En s'assurant que les colonies ne se développent pas trop vite, nous garantissons que les colonies auront des tailles similaires sur les acquisitions. Cette levure présente aussi l'avantage de se développer dans les conditions de température correspondant à celle du système d'acquisition, autour de 22.5 degrés Celsius.

Le protocole suivi pour la préparation des membranes est le suivant. 100 mL de fluide A (composé principalement d'eau et de minéraux et utilisé pour le test de stérilité) sont contaminés

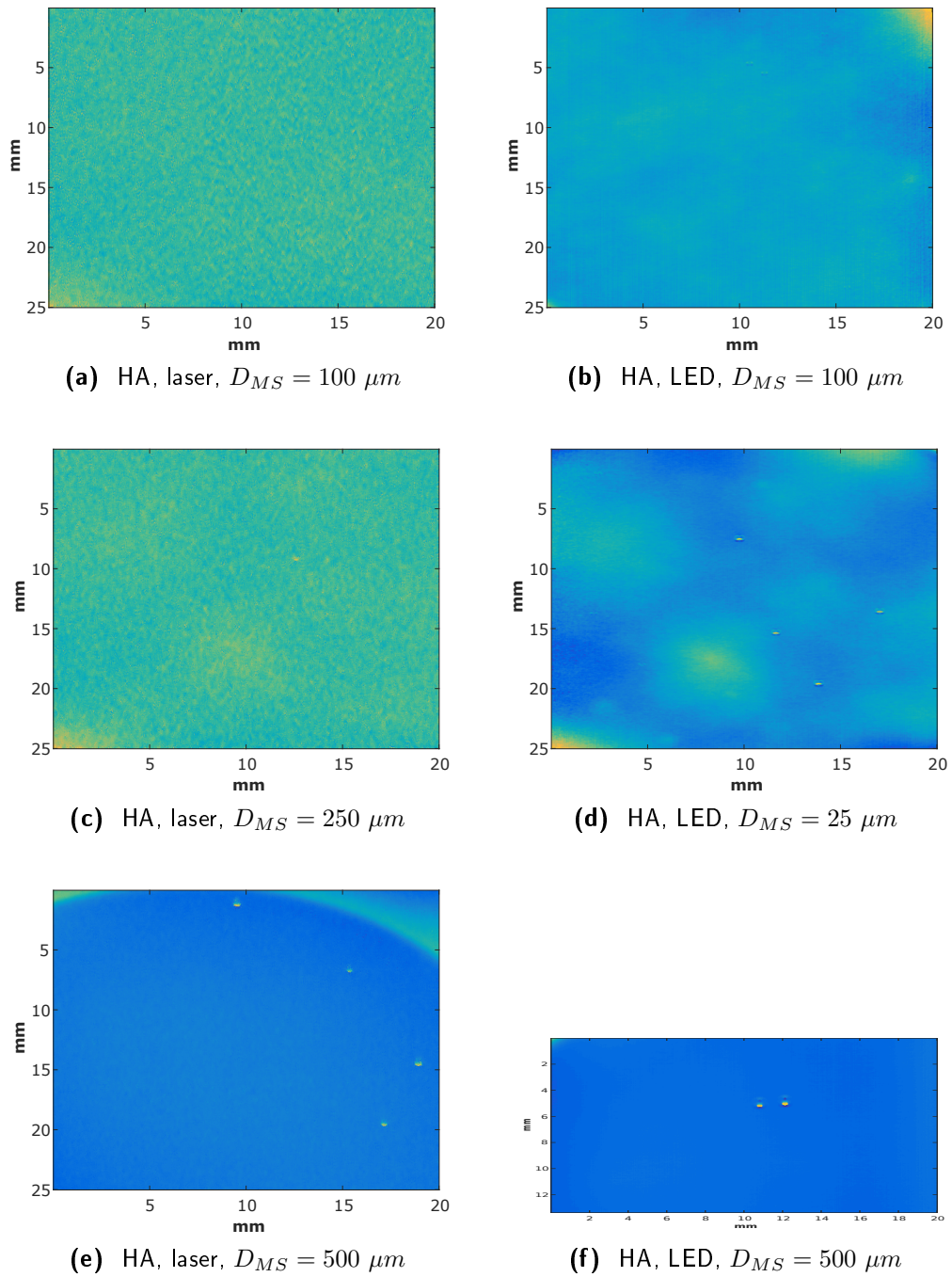


Figure 2.9 – Acquisitions sur membrane HA avec le laser et la LED pour différentes tailles de microsphères. Les images sont mises à la même échelle.

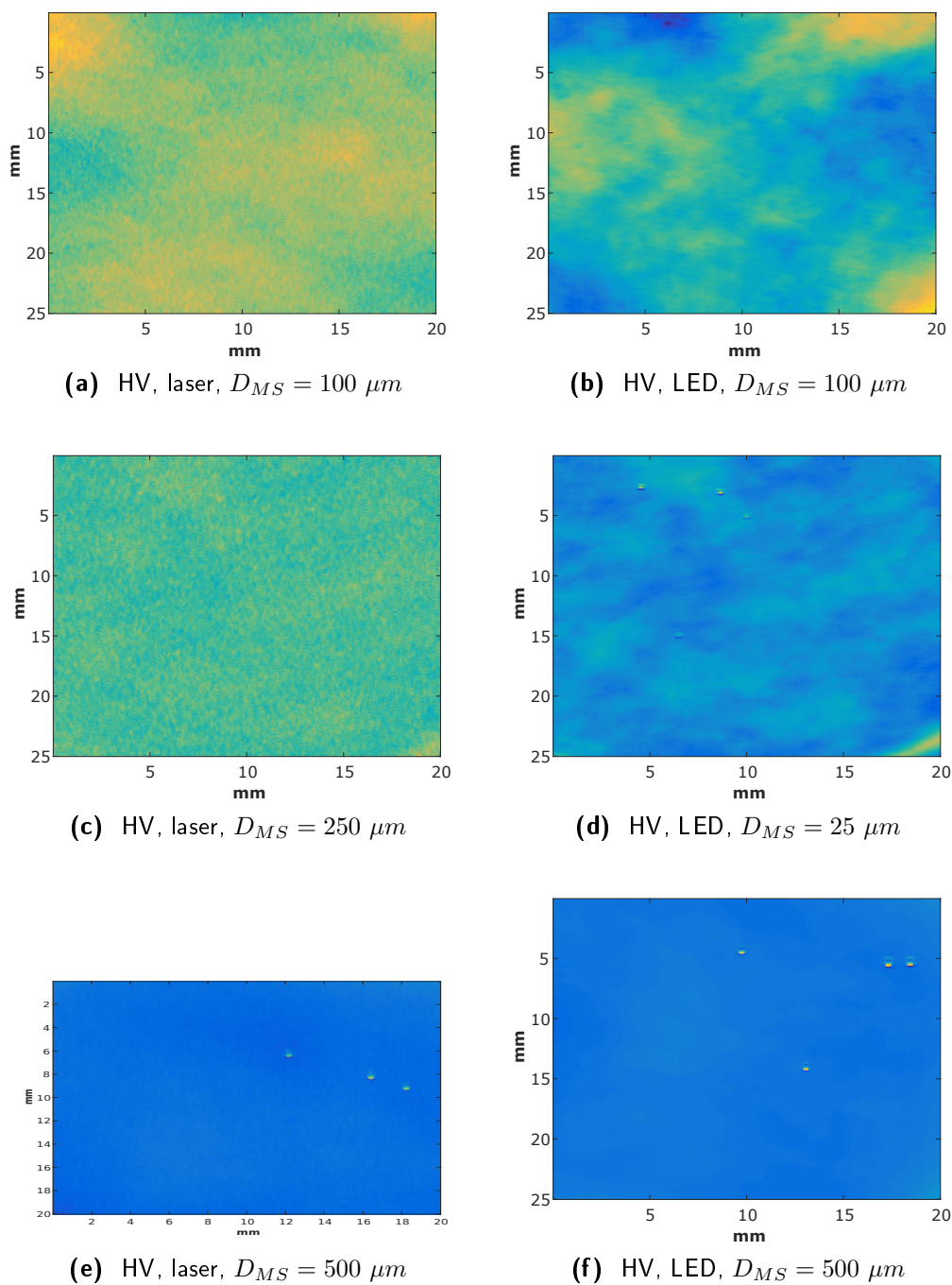


Figure 2.10 – Acquisitions sur membrane HV avec le laser et la LED pour différentes tailles de microsphères. Les images sont mises à la même échelle.

avec 15 à 25 CFUs de *D.anomala*, puis cette préparation est filtrée à travers une membrane HV grâce à une rampe de filtration et une pompe EZ-stream. La membrane est ensuite transférée sur une gélose TSA qui permet la croissance de ce micro-organisme. La nuit, l'ensemble est placé au réfrigérateur afin de stopper la croissance, dans le but de faire l'acquisition au moment où les colonies atteindront une taille proche de la limite de détection du système, respectivement équipé de la ligne LED et de la ligne laser.

Les résultats sont présentés Fig.2.11. Trois acquisitions sont réalisées, la première après 63h d'incubation, puis 26h après et encore 6h après. Ce temps n'est pas forcément représentatif d'une croissance classique des micro-organismes puisqu'il ne tient pas compte des réfrigérations successives. Ces dernières ralentissent la croissance puisqu'à chaque remise à température ambiante, les micro-organismes ont besoin d'une phase d'adaptation avant de se multiplier à nouveau. Cela fournit tout de même une base de comparaison et l'utilisation de la ligne LED permet de gagner 32h. Sur l'acquisition avec la LED, à T1, les micro-organismes sont déjà visibles. Cependant, les colonies ont la même taille que des artefacts présents sur la membrane, et les données ne permettent pas de faire la différence entre les deux. Ce point sera abordé par la suite (Sect.3.2).

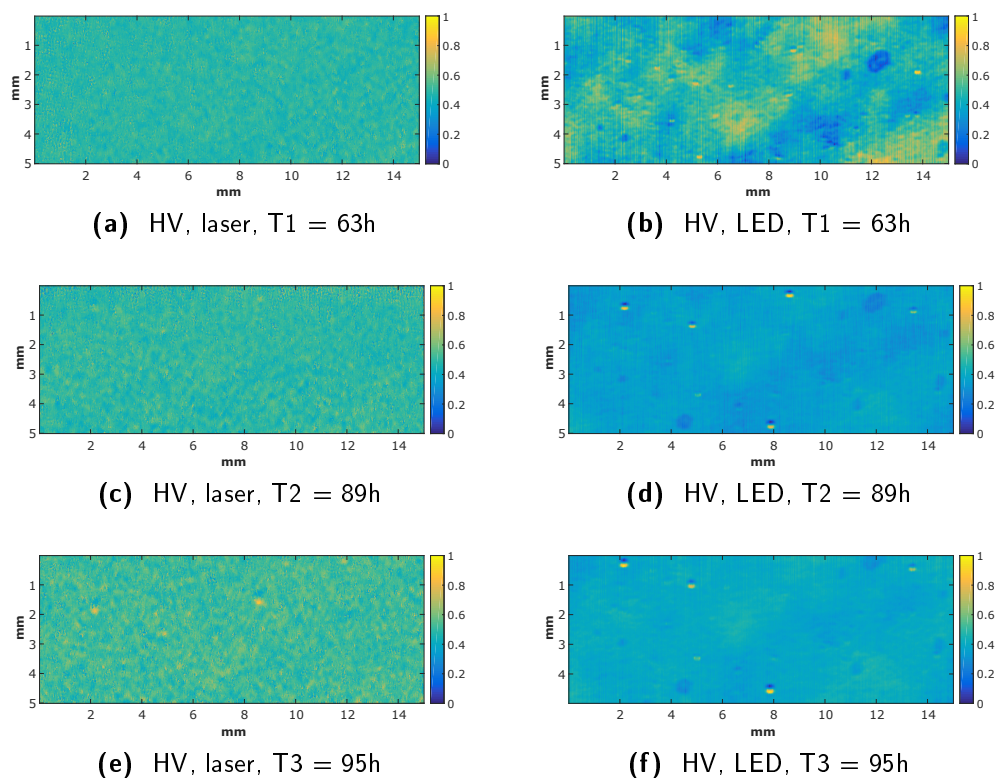


Figure 2.11 – Acquisitions sur membrane HV avec le laser et la LED sur des colonies de micro-organismes. Les images sont mises à la même échelle, et ont subi la même séquence de pré-traitements que pour les acquisitions sur micro-sphères.

Pour aller plus loin, nous comparons les colonies et les micro-sphères. Les colonies mesurent respectivement 13x12, 16x15 et 17x16 pixels à T1, T2 et T3. Nous nous basons sur la taille des micro-sphères de 75 μm , c'est-à-dire 18x18 pixels, pour en déduire que les colonies mesurent environ 52, 65 et 69 μm respectivement. Ceci suppose que les deux signaux sont comparables.

Or les colonies ont plutôt une forme gaussienne que sphérique [Wilkinson et Schut, 1998]. A cause de leur distribution, les colonies recouvrent une plus grande surface de la membrane à leur base que les micro-sphères. De plus, comme les membranes sont déposées sur une gélose, leurs propriétés optiques changent. Enfin, la texture de surface des colonies et des micro-sphères n'est pas la même. Tout ceci expliquerait que pour une taille similaire, les colonies sont détectables mais pas les micro-sphères.

Pour comparaison, une image acquise à T3 est présentée Fig.2.12. Sous un éclairage classique, les colonies n'offrent pas suffisamment de contraste sur la surface blanche pour être visibles. En utilisant un éclairage rasant il est par contre facile de les voir. Cependant cette méthode ne peut pas toujours être utilisée, par exemple si le contenant n'est pas transparent. Si le cas de *D.anomala* est particulièrement peu contrasté, il existe de nombreux supports différents pour la croissance et les micro-organismes peuvent avoir différentes couleurs. Il n'est donc pas improbable de se trouver dans une configuration peu contrastée.

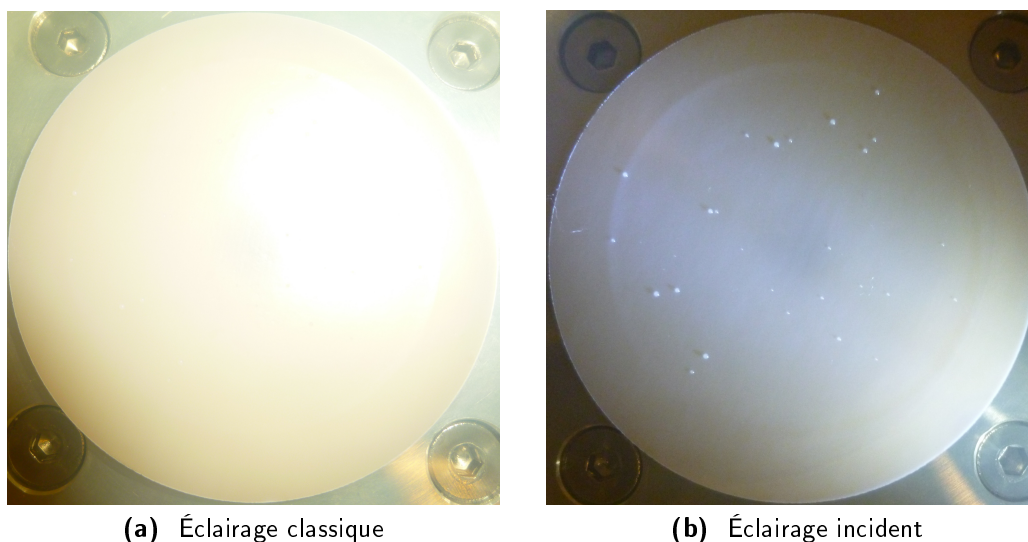


Figure 2.12 – Présentation des membranes avec colonies de *D.anomala* après la troisième acquisition.

Conclusion Nous pouvons retenir que l'utilisation d'une ligne LED permet de diminuer le bruit d'acquisition. Cela conduit à améliorer la résolution des acquisitions et donc à diminuer le temps d'incubation lorsque cette solution est appliquée à des colonies de micro-organismes. Ces résultats sont liés aux propriétés de la ligne elle-même, qui ne présente pas de speckle, est homogène et est suffisamment puissante et longue pour l'application de la triangulation à la détection de colonies. Ce travail a donné lieu à un article soumis au *Journal of Food Engineering*, donné en annexe (Ann.D). Dans le chapitre suivant, nous détaillons la mise en œuvre de cette ligne LED en présentant les prototypes réalisés et les choix faits pour permettre les acquisitions tout en respectant les contraintes du test de stérilité.

Chapitre 3

Mise en œuvre finale et acquisitions dynamiques

Introduction Au cours des deux chapitres précédents, nous avons décrit les différents éléments qui constituent la partie optique du système d'acquisition. Dans ce chapitre, nous présentons les prototypes réalisés et les choix de mise-en-œuvre associés (Sect.3.1). Nous détaillons ensuite la stratégie d'acquisition élaborée afin que celle-ci soit robuste (Sect.3.2). Nous présentons enfin des acquisitions sur des micro-organismes représentatifs réalisées en conditions réelles (Sect.3.3).

3.1 Le prototype complet

3.1.1 Réalisation

Autour de la caméra, de son optique et de la ligne, deux tables de déplacement sont ajoutées. L'une permet un mouvement de translation et l'autre de rotation. Les tables sont fabriquées par Thorlab, elles permettent un positionnement précis et atteignent une vitesse de 30 mm/s pour la table linéaire et $50^\circ/\text{s}$ pour la table de rotation. L'angle de triangulation est de 30° , mais l'ensemble caméra+ligne est incliné de 5° pour limiter les réflexions parasites du couvercle de la boîte vers la caméra.

Les boîtes contenant la gélose et la membrane sont incubées tête en bas, pour empêcher d'éventuelles gouttes de condensation de tomber sur les colonies et de les disperser. Le système est donc conçu pour respecter ce positionnement, et il est visible Fig.3.1. Les tables de déplacement sont retournées et placées au-dessus de la caméra qui regarde vers le haut.

Un mécanisme est ajouté sur la table de rotation afin de permettre la saisie des dispositifs de filtrations pour pouvoir les scanner. Les acquisitions sont faites à la vitesse de 27 mm/s . Cette vitesse combinée à la fréquence d'acquisition (1380 fps) permet d'obtenir un pas d'acquisition de $20 \mu\text{m}$ dans la direction du déplacement, qui est équivalent à la résolution le long de la ligne. La grille d'échantillonnage obtenue est donc régulière dans les deux directions.

Le tout est piloté par un ordinateur en se basant sur le logiciel Matlab. Il permet de piloter la caméra via sa DLL et les tables via leur activX. Une carte National Instrument, elle aussi interfacée avec Matlab, permet de plus de gérer le déclenchement de différents éléments comme

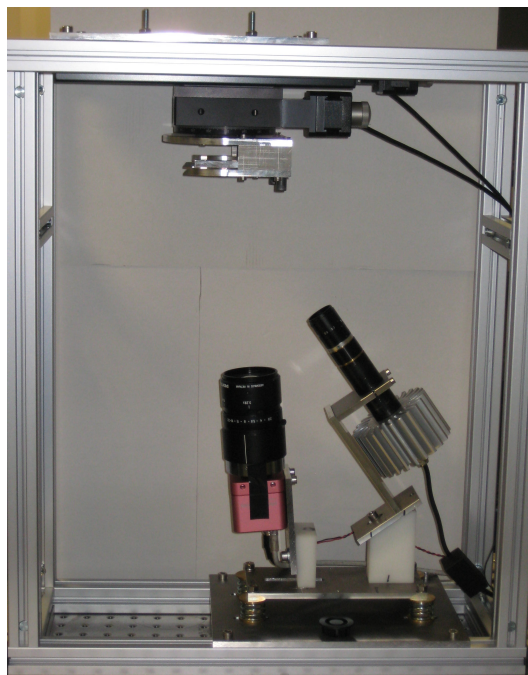


Figure 3.1 – Dispositif d’acquisition avec tous les éléments choisis, de haut en bas : table linéaire, table de rotation, pince de saisie et de maintien des membranes, ligne LED avec son radiateur, caméra avec l’optique choisie.

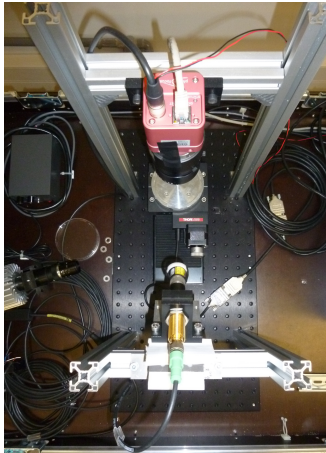
l’allumage de l’éclairage ou l’acquisition. Matlab permet aussi de développer rapidement les parties algorithmiques liées au traitement des images, ce qui facilite le prototypage du système. Dans la version finale du produit, il est prévu d’unifier tout l’automate dans un même langage, par exemple en C#.

Pour le prototypage, un dispositif d’éclairage a été ajouté afin de prendre une image en niveaux de gris de la zone scannée en 3D. Il est ainsi possible de comparer les résultats. L’ensemble du système d’acquisition est placé dans une boîte dont la température est contrôlée et régulée de manière à permettre la croissance de micro-organismes.

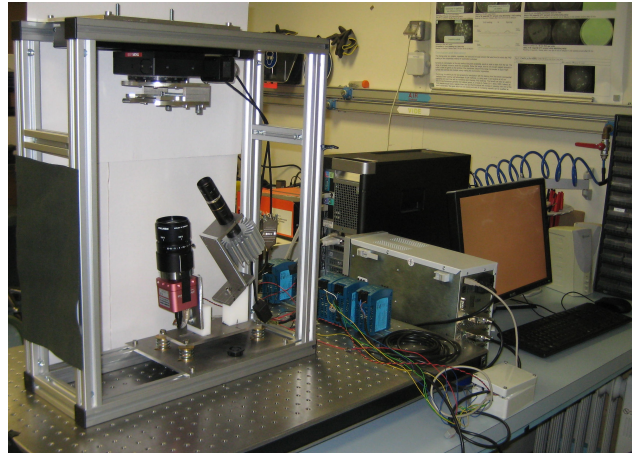
La Fig.3.2 montre les prototypes réalisés et utilisés pour les tests, en ne présentant que les plateformes équipées de la caméra 3D et du générateur de ligne. La première (Fig.3.2a) est celle utilisée pour les tests de caractérisation des lignes. Elle présente la configuration non-inversée pour faciliter les acquisitions, par exemple avec les micro-sphères. Elle est très flexible et est disponible à ICube. Les deux autres montages sont localisés à Merck et ont permis de faire des tests sur la mise en œuvre (Fig.3.2b) et des tests avec croissance de micro-organismes (Fig.3.2c). Ce dernier prototype est par ailleurs équipé d’un système de régulation de température (un échangeur Pelletier) pour contrôler l’environnement et permettre la pousse des micro-organismes pendant nos tests.

3.1.2 Parcours de la membrane

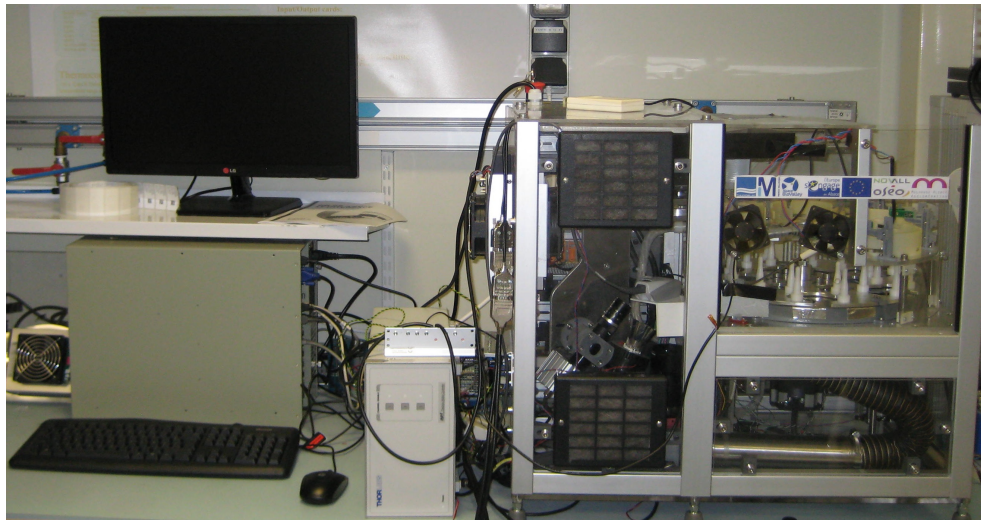
Le parcours de la membrane doit garantir qu’aucune zone n’a été manquée et optimiser le temps nécessaire à l’acquisition. Différentes façons de procéder ont été envisagées :



(a) Prototype 1 : Caractérisation (vue de dessus)



(b) Prototype 2 : Mise en œuvre : inversion du dispositif permettant le scan à l'envers.



(c) Prototype 3 : Tests sur colonies. Le dispositif d'acquisition est intégré à un système complet permettant la manipulation des membrane et de leur contenant.

Figure 3.2 – Présentation des prototypes réalisés.

- La première est de parcourir la membrane par bandes (Fig.3.3a). Cela crée de nombreuses zones d'ombre sur les bords de la membrane dues aux parois du dispositif d'incubation.
- Nous avons donc testé un parcours circulaire en deux tours complets (Fig.3.3b), qui permet l'acquisition de la totalité de la membrane. La quantité de données générée est très importante, et se déplacer de manière radiale implique que l'échantillonnage n'est pas régulier le long de la ligne.
- Une autre façon de procéder est de parcourir la membrane en plusieurs bandes le long de ses rayons, comme indiqué Fig.3.3c. Cela garantit à la fois d'acquérir la totalité de la membrane, de le faire en moins d'une minute et de réaliser un échantillonnage régulier.
- Cette dernière méthode a été améliorée tout au long de notre avancement pour aboutir à la version finale, un peu plus rapide. L'acquisition de manière séparée de la partie centrale y est supprimée en prolongeant les autres bandes vers le centre. Celles-ci sont toujours parcourues dans le même sens, de l'extérieur de la membrane vers l'intérieur (Fig.3.4) et elles ont la même configuration, ce qui facilite les traitements par la suite. Le parcours complet de la membrane avec les phases de préhension du dispositif contenant la membrane est effectué en moins d'une minute. Cette mise en œuvre fait l'objet du brevet Felden *et al.* [2014].

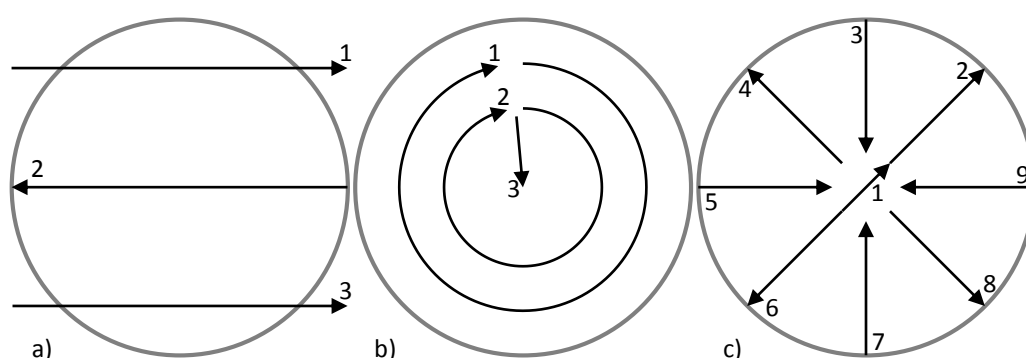


Figure 3.3 – Parcours de la membrane envisagés

Dans cette section, nous avons présenté les prototypes réalisés et décrit le parcours de la membrane garantissant une acquisition de toute la surface de la membrane, qui soit robuste et rapide. Nous nous intéressons à présent à la manière de faire les acquisitions.

3.2 Stratégie d'acquisition et contrôle-corréction de position

Le prototype de la Fig.3.2c nous a permis d'élaborer et de tester une stratégie afin de réduire le nombre de faux positifs et ainsi rendre la détection globalement plus robuste. D'un autre côté, l'utilisation de la triangulation impose de nouvelles contraintes qui sont discutées dans cette partie. Une solution basée à la fois sur le matériel et sur le traitement d'image est proposée.

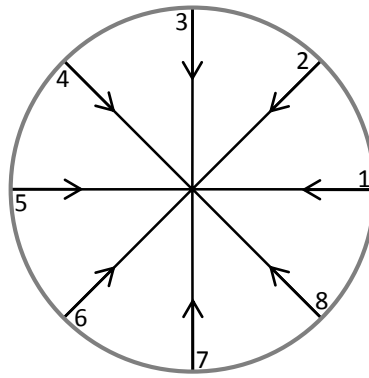


Figure 3.4 – Parcours de la membrane utilisé pour notre système. Les zones scannées se recouvrent mutuellement, ce qui garantit de scanner la totalité de la membrane, mais crée une redondance non négligeable dans les données. En effet, la surface de la membrane mesure 1734 mm^2 alors que la surface scannée est de 4000 mm^2 . Les données redondantes correspondent à 57% de la surface acquise. Certaines zones sont en effet parcourues jusqu'à 8 fois, comme le centre, et le scan est prolongé en dehors de la membrane.

3.2.1 Introduction et définition du problème de position

Lorsqu'un échantillon est filtré à travers une membrane, des résidus peuvent se déposer à la surface de celle-ci. Comme nous réalisons une acquisition 3D, ces résidus peuvent être confondus avec des colonies à certains stades de croissance. Ils forment en effet de petits amas dont la forme est identique aux colonies, comme le montre la Fig.3.5. Une caméra classique utilisera leur couleur pour les différencier, mais nous ne pouvons avoir recours à cette méthode. Pour les discriminer, nous nous sommes basés sur le fait que les colonies ne sont pas visibles au début de l'incubation et voient ensuite leur taille augmenter au cours du temps.

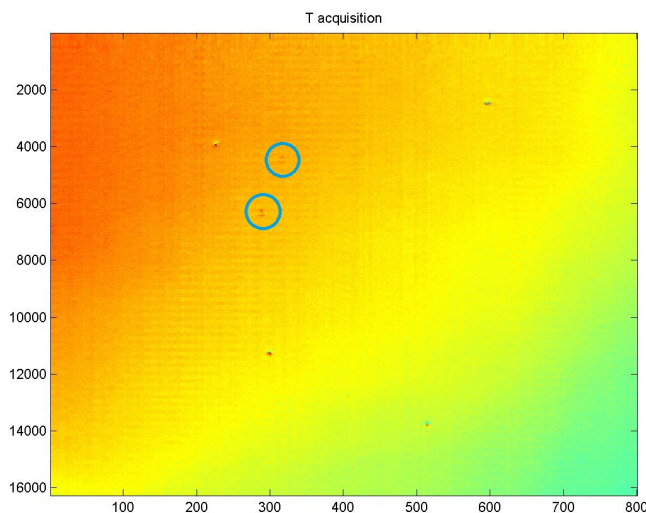


Figure 3.5 – Acquisition sur une membrane avec colonies (entourées) et particules. Il est difficile de différencier les deux sans information supplémentaire.

Deux acquisitions donc systématiquement réalisées. La première sert de référence et est acquise directement après la préparation de l'échantillon, à T_0 . L'acquisition suivante est réalisée à

la fin de la période d'incubation (T). Les objets détectés à T_0 ne devront donc pas être comptés comme des colonies. Cette méthode permet donc de réduire le taux de faux positifs. La Fig.3.6 schématise le processus d'acquisition et de traitement afin d'arriver à la détection des colonies tout en minimisant le taux de faux positifs.

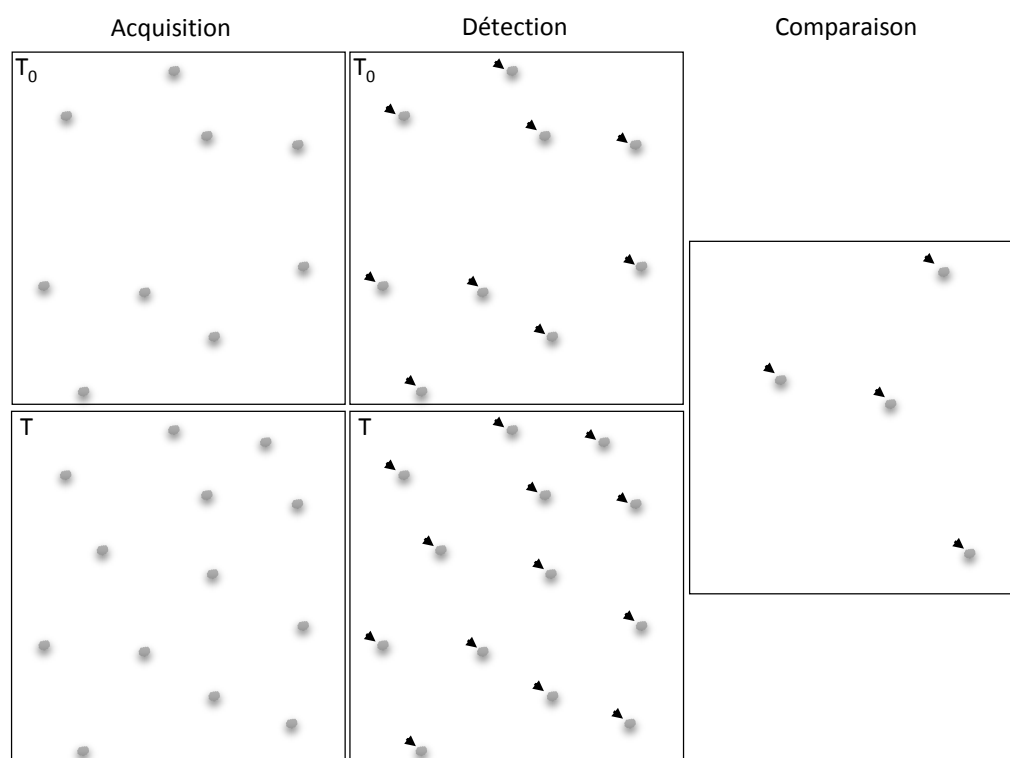


Figure 3.6 – Principe général des acquisitions garantissant un faible taux de faux positifs. Les points noirs correspondent aux objets présents et les flèches pointent les détections. En comparant les objets détectés à T_0 et à T , il est possible de les discriminer.

Il faut noter que le choix de faire seulement deux acquisitions n'est pas imposé. La possibilité est laissée pour le futur de scanner les membranes plusieurs fois au cours de l'incubation. Il sera ainsi possible de réduire le temps d'incubation pour les résultats positifs. Cela donne également de nouvelles données pour construire et aider la détection.

Cependant, pour être capable d'identifier les particules entre T_0 et T , il faut pouvoir les localiser correctement et donc s'assurer que les deux images comparées sont recalées. Cela peut se faire en amont de l'acquisition (méthode matérielle), en aval (recalage des images) ou les deux. Puisque les deux images concernent la même membrane dans le même dispositif, l'erreur de recalage entre les deux est uniquement due au mauvais positionnement du dispositif dans le système. Grâce à la profondeur de champ de ce dernier, l'acquisition est suffisamment robuste à l'erreur verticale. Les deux autres familles d'erreurs sont liées à un mauvais calage du dispositif dans le système de retenue, soit le dispositif n'est pas en butée et donc l'erreur est selon l'axe de déplacement de la table, soit le dispositif a tourné lors de la préhension, et l'erreur est un décalage angulaire (une rotation).

Lors du recalage, les déformations angulaires sont plus difficiles à traiter et peuvent créer des artefacts lors de la reconstruction de l'image, car la grille d'échantillonnage est rectangulaire.

Au contraire, les déformations axiales, surtout quand elles sont parallèles à un des axes de la grille, sont faciles à corriger puisqu'elles correspondent à une translation de cette dernière. Elles ont aussi l'avantage de ne pas introduire d'artefacts ou de distorsion. C'est pour ces raisons que nous avons choisi d'affiner au mieux le positionnement en rotation du dispositif avant de faire l'acquisition.

Il ne reste alors plus qu'une erreur de translation à corriger. Au fur et à mesure de l'élaboration du système, cette erreur a été plus ou moins importante. Dans la dernière phase du projet, nous avons envisagé de munir la table de translation d'une règle magnétique, afin de connaître la position de la table et déclencher les acquisitions à intervalle spatial régulier. En plus de rendre l'acquisition indépendante de la vitesse, nous aurions ainsi été capable de réduire le mauvais positionnement linéaire du dispositif. L'erreur restante est corrigée si besoin par recalage des données et possible grâce à la marge prise lors de l'acquisition, pour prendre un peu plus de données que nécessaire.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons au recalage en rotation. Bien que des guides mécaniques soient ajoutés au système, ils ne garantissent pas un positionnement parfait. Des repères ont donc été créés sur le dispositif afin de s'assurer du bon positionnement de l'objet dans la pince, et le cas échéant, faire la correction d'angle.

3.2.2 Méthode

Les repères sont deux petits ergots disposés le long de la membrane pour qu'ils soient proches de la zone d'acquisition et ainsi limiter les déplacements et la perte de temps. Ils sont visibles Fig.3.7a. Pour ne pas rajouter un nouveau dispositif au système, nous souhaitons utiliser la caméra 3D. Nous sommes donc limités à deux types d'acquisitions pour le recalage. La première solution est de scanner les ergots en 3D et de les détecter dans l'acquisition grâce à leur hauteur (deux pics allongés). La seconde solution est d'utiliser la caméra en mode 2D et donc d'avoir une image en niveau de gris de la zone contenant les repères. C'est cette solution que nous retenons car elle est la plus rapide en temps d'acquisition. L'acquisition en niveaux de gris est également moins bruitée qu'en 3D car le plastique absorbe une partie de la lumière de la ligne. La Fig.3.7b montre une acquisition. La partie blanche correspond à la membrane et les ergots sont visibles sur le bord. Nous ne cherchons pas à ce que tous les dispositifs aient la même position, nous voulons seulement nous assurer que, d'une acquisition à l'autre, cette position est la même. Lors de l'acquisition à T_0 , nous nous limitons donc à la prise d'image, et c'est lors des acquisitions suivantes que le dispositif est recalé de manière à ce qu'il soit toujours dans la position initiale.

Cette méthode présente l'intérêt de ne recalcr ensemble que des images du même dispositif. Un défaut de moulage ou lié à la préparation de l'échantillon ne sera donc pas un obstacle lors de l'estimation puisqu'il sera présent sur toutes les acquisitions. Les principales variations entre deux acquisitions sont liées à l'éclairage et bien sûr à l'angle. Afin d'estimer celui-ci, nous avons envisagé d'utiliser les méthodes classiques de recalage. Notre problème est assez simple puisque nous savons que la déformation est globale (toute l'image) et rigide (rotation et translation). Cependant, l'image est grande (2048x1088 pixels) en comparaison de la taille des ergots (environ 200x30 pixels) qui sont la seule information indiquant le changement de position angulaire. C'est pour cette raison que nous cherchons dans un premier temps à réduire l'image pour ne conserver

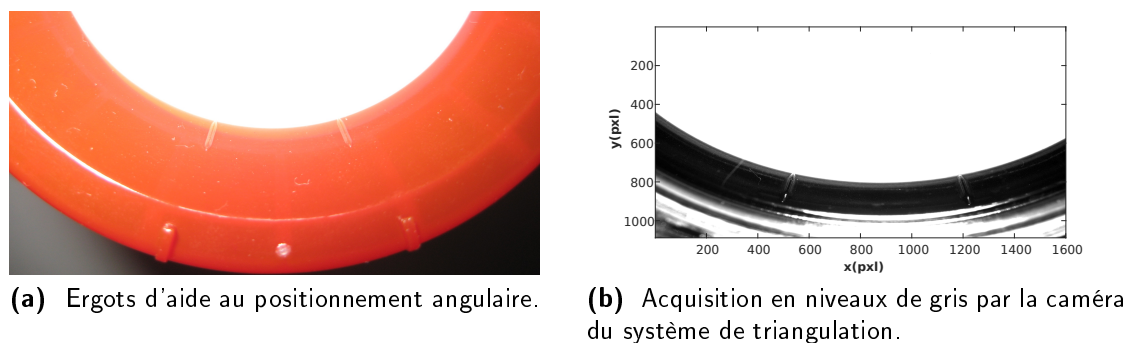


Figure 3.7 – Image en couleur et acquisition correspondante.

que la zone qui contient les ergots, c'est-à-dire le bord de la membrane. Nous nous servons de la membrane pour estimer la position du centre du dispositif en détectant son bord. Ceci est facilité par le fait que la transition entre la membrane (très claire) et la pièce en plastique (foncée) est très marquée. Ce contour est détecté grâce au classique filtre de Canny [Canny, 1986]. Nous utilisons ensuite la transformée de Hough généralisée [Duda et Hart, 1972] sur les contours détectés pour trouver le contour qui correspond au bord circulaire de la membrane. Cela permet de délimiter la zone d'intérêt qui contient les ergots (Fig.3.8a).

Une méthode classique de recalage angulaire consiste à faire tourner une des deux images de différents angles et à retenir celui qui minimise un critère de similarité entre la seconde image et l'image tournée. Cependant, cela nécessite de nombreux calculs car pour chaque angle testé, l'image pivotée et le critère de similarité doivent être estimés. Grâce à la transformée de Hough, la position du centre du dispositif est connue. Cette information est utilisée pour représenter les données dans un espace polaire, ce qui permet de ne faire qu'une seule transformation sur les données. Dans ce repère, chaque ligne correspond à un rayon du disque détecté auparavant, et une rotation correspond à une translation le long de l'axe θ . Cela donne la Fig.3.8b, où les ergots sont le long des lignes. En sommant les valeurs le long de chaque ligne, la dimension des données est réduite tout en conservant le signal discriminant.

Ce procédé est appliqué séparément sur les deux images à comparer, celle de T_0 et celle de l'acquisition en cours. Cela donne donc deux signaux 1D qui comportent chacun deux pics correspondants aux deux ergots (Fig.3.9a). Le décalage angulaire entre les deux acquisitions est lié à la translation entre ces deux paires de pics. Nous calculons la corrélation croisée entre ceux-ci et la position du pic de corrélation est proportionnelle au décalage (Fig.3.9b). Nous en déduisons l'angle entre les deux positionnements du dispositif, que nous pouvons ensuite corriger au moyen de la table de rotation.

3.2.3 Résultats et performances

Pour tester les performances de notre méthode, nous avons réalisé des acquisitions avec des décalages connus. Ces décalages sont obtenus avec la table en rotation. Nous utilisons ensuite le procédé décrit pour estimer l'angle entre les acquisitions. Le tableau détaillant les résultats obtenus est donné en Fig.3.10. L'erreur moyenne absolue constatée entre le décalage réel et le

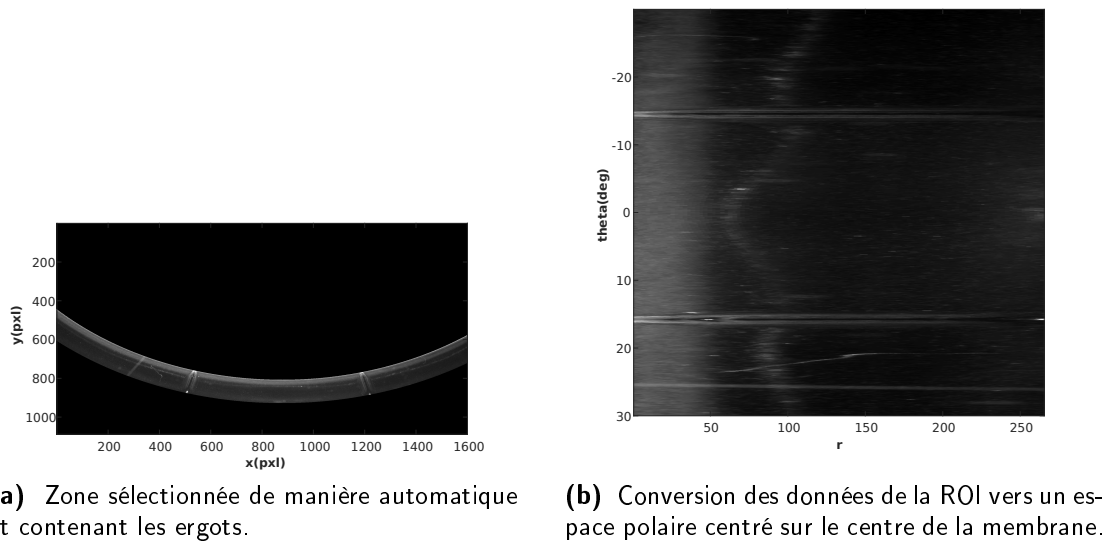


Figure 3.8 – Sélection de la zone d'intérêt et transformation vers un repère polaire.

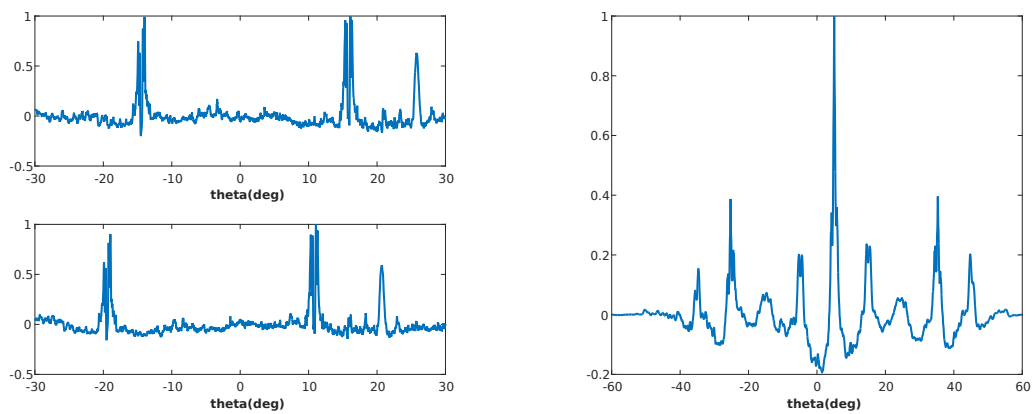


Figure 3.9 – Estimation de l'angle.

décalage estimé est de 0.03° , pour des angles allant de -5° à 5° . L'écart type de l'erreur absolue est de 0.02° , ce qui donne donc un décalage, dans le cas le pire, de 0.05° , ce qui correspond (au bord de la membrane) à la taille des pixels ($20\mu m$) dans l'image. Nous considérons donc que cette erreur est suffisamment petite et donc acceptable pour notre application.

Dispositif :		Dispositif :		Dispositif : Bleu + Couvercle	
Angle réel	Angle estimé	Angle réel	Angle estimé	Angle réel	Angle estimé
-5°	-5.03°	-5°	-4.95°	-5°	-5.07°
-4°	-4.05°	-4°	-3.95°	-4°	-3.97°
-3°	-3.03°	-3°	-3.02°	-3°	-2.93°
-2°	-2.00°	-2°	-1.98°	-2°	-1.95°
-1°	-0.98°	-1°	-0.95°	-1°	-0.98°
-0.5°	-0.48°	-0.5°	-0.5°	-0.5°	-0.47°
0°	0.02°	0°	0.02°	0°	-0.37°
0.5°	0.55°	0.5°	0.53°	0.1°	-0.27°
1°	0.97°	1°	1.02°	0.2°	-0.17°
2°	2.00°	2°	2.03°	0.3°	-0.08°
3°	3.02°	3°	3.07°	0.4°	0.02°
4°	4.06°	4°	4.07°	0.5°	0.12°
5°	5.03°	5°	5.08°	0.6°	0.23°
				0.7°	0.33°
				0.8°	0.4°
				0.9°	0.52°
				1°	0.63°
				2°	0.72°
				3°	0.82°
				4°	0.92°
				5°	1.02°
					2.00°
					2.98°
					4°
					5°

Figure 3.10 – Valeurs d'angles estimées grâce à l'algorithme sur des données dont le décalage en rotation est connu.

L'algorithme est lancé sur un processeur 64-bits Intel Xeon CPU E5-2687W 0 cadencé à 3.10GHz, avec 32GB de mémoire RAM et Matlab R2012a. Le temps de calcul est variable selon la couleur du dispositif considéré. Il prend environ 13s avec du rouge, et autour de 6s avec du bleu. Le rouge est plus clair sur l'image en niveaux de gris, ce qui crée plus d'artefacts sur l'image, et donc donne plus de points de contour. Cela prend donc plus longtemps pour calculer la transformée de Hough. Cependant, même dans le cas le pire (rouge), le délai est acceptable dans le temps imparti pour l'application.

Dans cette section, nous avons mis en place une stratégie de détection basée sur une double acquisition permettant d'établir une image référence à T_0 . Pour s'assurer de la robustesse de la détection, la position du dispositif est vérifiée avant chaque acquisition afin d'obtenir un recalage optimal des données. Dans la suite, nous nous intéressons aux acquisitions.

3.3 Acquisitions en conditions réelles

Le procédé d'acquisition retenu est constitué de différentes étapes, décrites ici. Grâce aux différents prototypes et en suivant le parcours de la membrane décrit, des acquisitions ont été faites qui ont finalement démontré les capacités du système à détecter les colonies. Nous regardons tout d'abord les membranes seules, puis nous nous intéressons aux micro-organismes.

3.3.1 Description du procédé pour le nouveau test de stérilité

La plateforme présentée au début de ce chapitre (Fig.3.2c) comporte également, sur la droite, différents éléments qui permettent l'automatisation de l'acquisition. Les dispositifs contenant les membranes sont disposés dans des racks après la filtration. Ces racks s'adaptent sur le dessus de la plateforme qui est équipée de pistons. Ces derniers viennent chercher les dispositifs un par un pour les déposer sur un plateau. Quand le plateau est chargé, ce qui correspond à 8 membranes, soit 4 tests, il commence un cycle de rotation rapide puis plus lente, combiné à un chauffage réalisé par une turbine à air. Cette étape permet de débarrasser le couvercle d'éventuelles gouttes ou condensation. Suite à cette séquence, les membranes sont chargées une à une dans le dispositif de maintien du système de lecture et l'acquisition est faite. La membrane est à nouveau chargée sur le plateau. Une fois que les 8 dispositifs ont été parcourus et acquis, le plateau est déchargé dans les racks.

Ce processus est répété à chaque acquisition. Le cycle correspondant à un test de stérilité est décrit Fig.3.11. Pour chaque test, un échantillon est donc filtré puis séparé de manière égale entre deux dispositifs, c'est-à-dire à travers deux membranes. Les dispositifs sont remplis, chacun avec un type de milieu de culture. Ils sont ensuite placés chacun dans un rack. Une fois tous les tests préparés, les racks sont connectés à la plateforme de lecture et les acquisitions sont réalisées. Lorsqu'elles sont faites, les racks sont placés dans deux étuves, l'une à 22.5 ° C et l'autre à 32.5 ° C. Après cinq jours au maximum, les racks sont sortis et scannés à nouveau. Cette fois, les données acquises sont traitées pour détecter d'éventuelles colonies. En l'absence de micro-organisme, le lot correspondant à l'échantillon peut être libéré sur le marché. Dans le cas contraire, l'échantillon est ré-incubé afin de pouvoir procéder à l'identification du micro-organisme.

Cette manière de procéder reste très similaire au test actuel. Le principal changement pour le client en dehors de l'automatisation est l'ajout de l'étape d'acquisition à T_0 , qui implique une manipulation supplémentaire. Dans la suite, nous donnons quelques exemples de données acquises avec le système.

3.3.2 Cas des membranes HA et HV

Les membranes sont préparées de la même façon que pour un test de stérilité. 100 mL de Fluide A constituent l'échantillon qui est filtré. La membrane est déposée sur une gélose SDA et scannée selon le schéma décrit dans la Sect.3.1.2. La Fig.3.12 montre une zone de cette membrane de taille 970x970 pixels. Le même pré-traitement est appliqué, consistant à supprimer la moyenne des lignes et des colonnes, à régulariser la forme de la membrane grâce à une régression polynomiale du second degré et à appliquer un filtrage médian (taille 3). Le fait de prendre les images en se déplaçant augmente le bruit de manière significative. La membrane HA passe d'une variance de

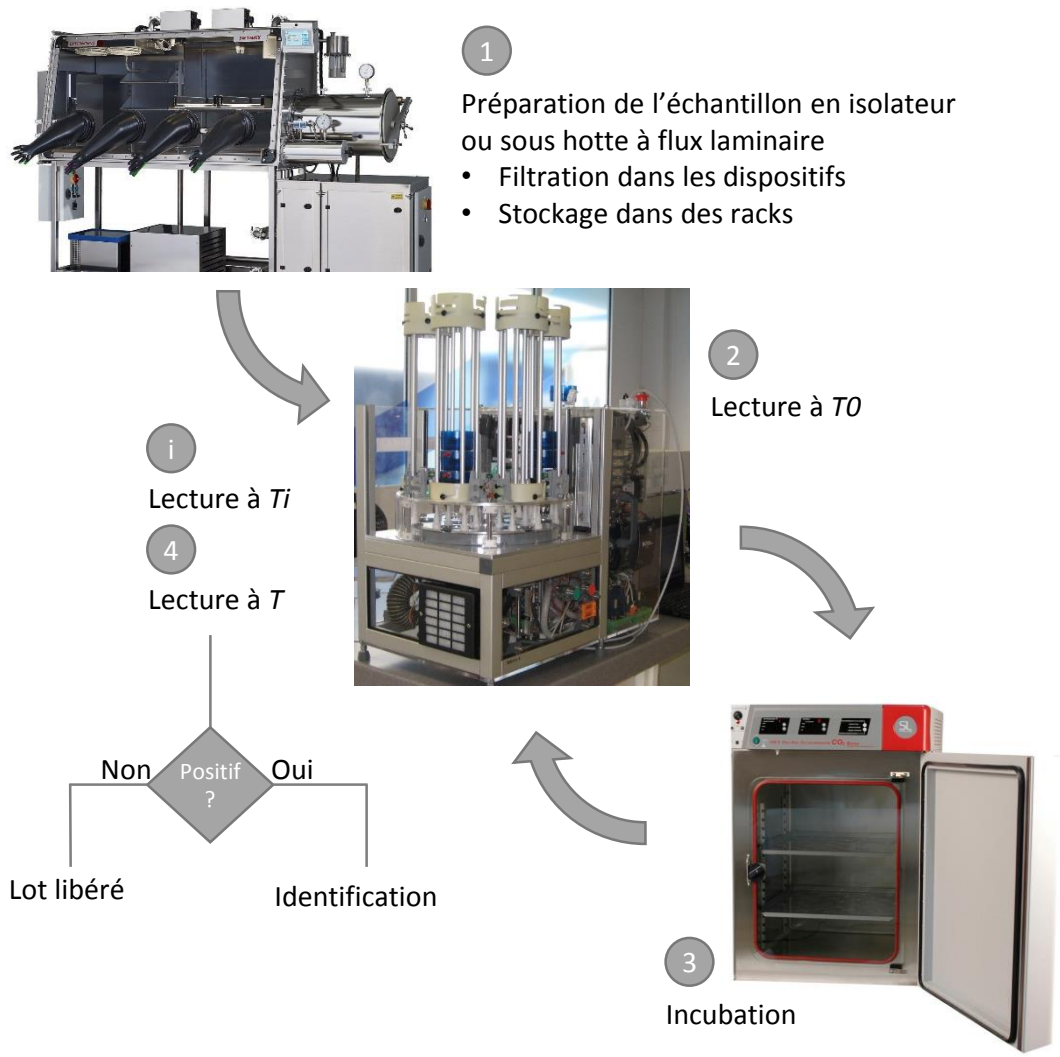


Figure 3.11 – Étapes du nouveau test de stérilité

0.02 à 0.07 (unité de hauteur arbitraire), soit multipliée par 3.5. Mais c'est le cas de la membrane HV qui est le plus marqué. Le fait d'être déposé sur une gélose, donc humide augmente encore plus la différence, le rapport étant de 24. Ce phénomène est dû aux gouttes d'eau qui saturent la membrane et rendent sa surface chatoyante.

Alors que sèche, la membrane HA crée un signal plus bruité que la membrane HV, c'est le contraire que nous observons ici, la première étant 3.6 fois moins bruitée. La membrane HA favorise donc le but que nous nous sommes fixés de réduire le temps de détection en augmentant le rapport signal sur bruit.

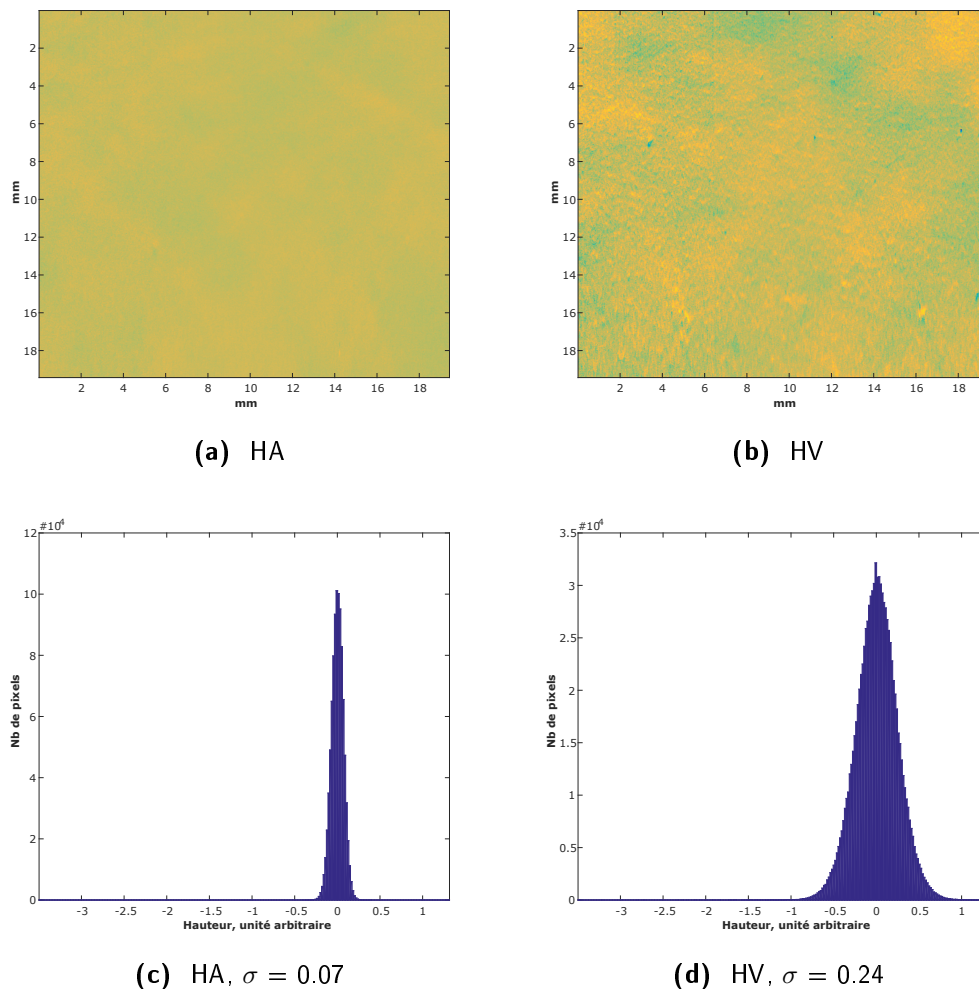
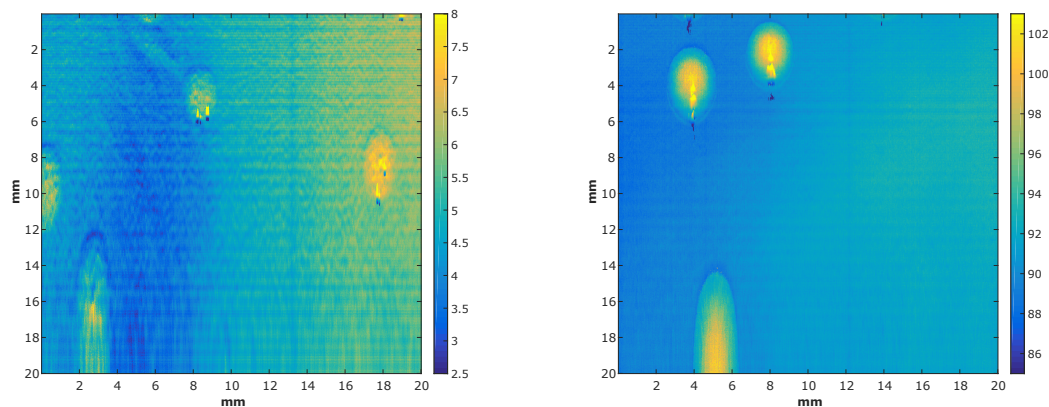


Figure 3.12 – Surfaces mesurées des deux types de membranes, représentées à la même échelle, avec les histogrammes correspondants, également représentés à la même échelle.

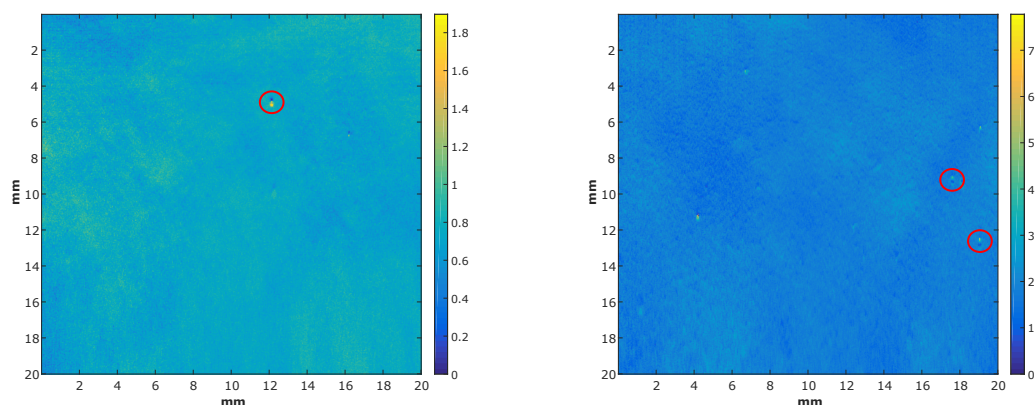
3.3.3 Cas des membranes HA et HV en présence de colonies

Nous avons déjà vu lors de la caractérisation des lignes que nous sommes capables de réaliser des acquisitions sur des colonies de micro-organismes à un stade de croissance précoce. Ces acquisitions avaient été faites dans des conditions favorisant le rapport signal sur bruit : acquisition statique, pas-à-pas, avec réduction du bruit par moyennage. Nous observons à présent quelques acquisitions dynamiques réalisées sur des colonies de micro-organismes, c'est-à-dire dans

les conditions du nouveau test de stérilité. Nous utilisons toujours le même procédé de filtration puis dépôt sur gélose. Le type de gélose utilisé dépend du micro-organisme, afin de placer ce dernier dans des conditions de croissance optimales. Nous avons utilisé *Pseudomonas aeruginosa* et *Methylobacterium extorquens*, et nous les avons déposés respectivement sur gélose TSA et R2A.



(a) *P. aeruginosa*, HA, TSA, $D_i = 2$ jours, image brute : 4 colonies
 (b) *P. aeruginosa*, HV, TSA, $D_i = 2$ jours, image brute : 3 colonies



(c) *M. extorquens*, HA, R2A, $D_i = 3$ jours, après pré-traitement : 1 colonie
 (d) *M. extorquens*, HV, R2A, $D_i = 3$ jours, après pré-traitement : 2 colonies

Figure 3.13 – Acquisitions sur membranes HA et HV en présence de deux micro-organismes sur deux milieux de culture. Les durées d'incubation (D_i) sont différentes car la croissance des micro-organismes dépend de chacun d'eux. Dans les cas où ceux-ci sont plus développés, aucun pré-traitement n'est appliqué car le bruit est alors négligeable par rapport au signal correspondant aux colonies. Les colonies les plus petites sont entourées en rouge et l'échelle des couleurs correspondant à la hauteur pour chaque image est donnée.

D'après la Fig.3.13, *P. aeruginosa* se développe plus vite que *M. extorquens*. Dans les Fig.3.13a et 3.13d la texture granuleuse qui est visible correspond à la présence de condensation sur le couvercle de la boîte de Petri. D'autres artefacts sont présents, comme des particules qui ont la taille des colonies. Ces deux cas sont représentatifs des acquisitions sur colonies de bactéries ou de levures, et montrent donc qu'il est possible d'utiliser la triangulation pour détecter ces colonies. Dans le cas des micro-organismes se développant lentement, un gain est même constaté

par rapport à une détection visuelle.

Conclusion Nous venons de voir les premières acquisitions en conditions réelles avec et sans micro-organismes. Ces acquisitions montrent de manière qualitative la faisabilité de la méthode basée sur la triangulation. Dans ce chapitre, nous avons également présenté les prototypes construits et le parcours choisi pour réaliser l'acquisition de la totalité de la surface de la membrane. Nous avons également mis en place une stratégie d'acquisition permettant de différencier les colonies d'autres objets éventuellement présents sur la membrane. Cette mise en œuvre fait l'objet d'un brevet [Felden *et al.*, 2014] déposé et en cours d'examen. Dans le chapitre suivant, nous présentons les défis liés au traitement des images acquises pour détecter les colonies de micro-organismes.

Chapitre 4

Algorithme pour la détection

Introduction Les membranes sont numérisées dans le but de détecter les éventuelles colonies de manière précoce et robuste. Dans le cadre de cette version automatisée du test de stérilité, les acquisitions sont faites après cinq jours d'incubation. Pour certains micro-organismes, cela signifie qu'ils ont eu peu de temps pour se développer et donc que les colonies sont petites, ce qui rend la détection plus difficile. Les normes concernant le test de stérilité requièrent des taux de faux positifs et faux négatifs faibles. Les valeurs fixées par le cahier des charges pour ces deux taux sont de 1% au maximum.

Dans ce chapitre, nous présentons tout d'abord les données à traiter (Sect.4.1), nous nous intéressons ensuite à l'état de l'art concernant les algorithmes de détection (Sect.4.2) et présentons une première méthode qui servira de référence (Sect.4.3). Finalement, nous proposons notre méthode de détection, inspirée de concepts liés à la détection de données aberrantes (Sect.4.4).

4.1 Présentation des données

Dans la Sect.3.1.2, nous avons expliqué que la membrane est balayée en 8 bandes. Les images à traiter correspondent donc aux données de hauteur pour ces 8 zones. Les images brutes sont de taille 2048x2681 pixels. Comme la ligne LED, du fait de sa longueur et de son inhomogénéité aux extrémités (voir Sect.2.2), ne permet une mesure robuste que sur 1000 pixels, nous nous restreignons à des images de 1000x2681 pixels. Seule une partie de cette image correspond à la membrane et le reste ne nous intéresse pas puisqu'il représente soit le bord de maintien de la membrane dans le dispositif de filtration, soit, pour nos tests, le milieu de culture gélosé sur lequel la membrane est déposée. Dans les tests présentés par la suite, nous travaillons sur des zones réduites choisies dans la région correspondant à la membrane. Leur taille est de 256x256 pixels. Dans cette section, nous proposons de présenter les données et les traitements mis en place pour les pré-traiter. Nous étudierons ensuite les artefacts que nous corrigeons avant l'acquisition et ceux que l'algorithme de détection devra pouvoir compenser ou traiter. Tous les résultats sont donnés pour les deux types de membrane.

4.1.1 Correction

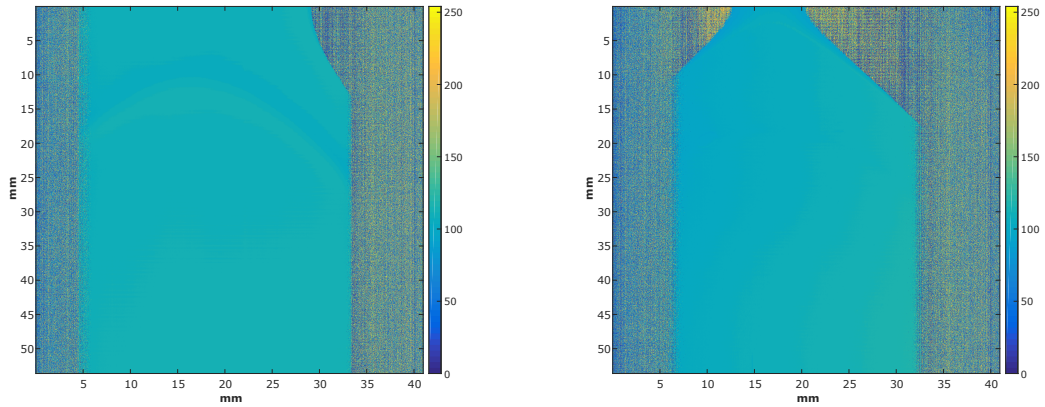
Les Figs.4.1a et 4.1b montrent les données brutes puis ces mêmes données sont rognées (Figs.4.1c et 4.1d), c'est-à-dire que nous ne conservons que la zone d'intérêt correspondant à la membrane. Les vibrations dues au déplacement de la membrane pendant l'acquisition créent des artefacts horizontaux visibles dans les acquisitions. C'est pour cela que les mêmes pré-traitements que ceux utilisés lors de la caractérisation sont appliqués (voir Sect.2.3). Cela donne pour chaque membrane les surfaces des Figs.4.1e et 4.1f.

Nous pouvons dès lors aller plus loin dans l'étude des surfaces. Si nous avons déjà observé auparavant leurs propriétés sur des données statiques, nous regardons à présent ce qu'il en est des données acquises en conditions réelles, de manière dynamique et sur des membranes déposées sur agar. La Fig.4.2 montre les distributions des hauteurs pour les deux types de membranes, et en encart la comparaison de ces distributions avec une distribution gaussienne centrée réduite. Dans les deux cas, les données sont proches de cette distribution. Des écarts sont observés pour les queues des distributions, correspondant aux artefacts visibles sur les acquisitions (Figs.4.1e et 4.1f). Cependant, ces divergences ne concernent que peu de points et n'ont donc pas une influence majeure sur les données, aussi nous pouvons considérer que les surfaces des deux membranes présentent un comportement gaussien. Comme nous l'avons vu dans la Sect.3.3, le diagramme quantile-quantile confirme que la membrane HV présente plus d'irrégularités que la membrane HA. En particulier, ce sont les valeurs faibles qui sont impactées, c'est-à-dire qu'il y a de nombreux creux dans la membrane. Cet effet est lié à l'artefact en haut à droite de l'acquisition, ainsi qu'aux micro-structures de la surface.

4.1.2 Artefacts

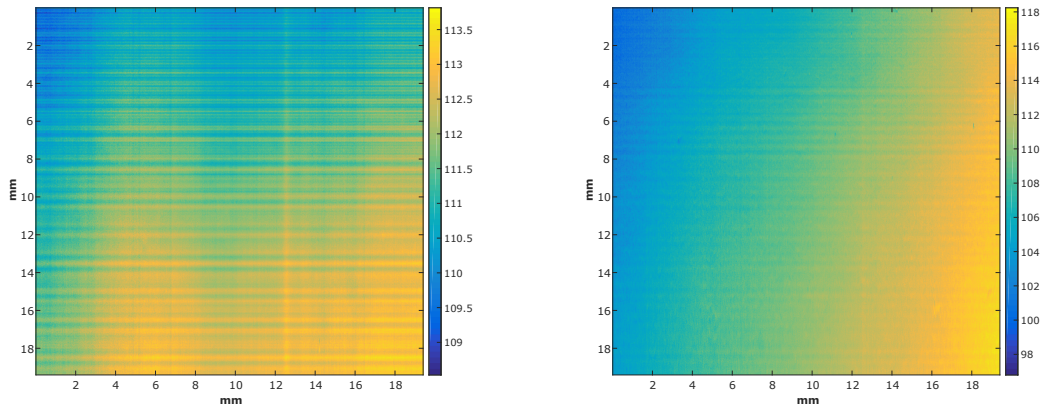
Nous nous intéressons ici aux différents artefacts qui apparaissent dans les données acquises dans les conditions de l'application. En effet, le dispositif dans lequel la membrane est placée crée de nouveaux phénomènes. Ce dispositif est celui présenté en introduction et utilisé dans la Sect.3.2 pour le recalage en rotation. Nous présentons rapidement les artefacts rencontrés, mais nous n'avons pas testé les algorithmes dans cette configuration car notre travail s'est concentré sur le dispositif précédent. Les différents artefacts observables sont liés au couvercle, au support de la membrane (le drain) ainsi qu'à la membrane elle-même.

Le couvercle est bien sûr transparent. Cependant divers phénomènes peuvent créer des artefacts au moment de l'acquisition. Citons par exemple : l'apparition d'une rayure, une goutte résiduelle provenant de la filtration ou de la condensation. La Fig.4.3 illustre chacun de ces artefacts. Le principal problème lié aux défauts sur le couvercle est qu'ils peuvent empêcher de voir une colonie qui se serait développée à la verticale du défaut sur la membrane. Des moyens pour éviter ces phénomènes ont donc été mis en œuvre. Ainsi, la forme du couvercle avec un rebord circulaire surélevé permet de protéger la vitre pendant les manipulations et lorsque ceux-ci sont empilés. De plus, le système de lecture a été équipé d'un module permettant de supprimer à la fois les gouttes résiduelles et la condensation éventuellement présentes sur le couvercle avant chaque acquisition. Ce procédé consiste en une phase de centrifugation combinée à une phase de chauffage ayant lui aussi fait l'objet d'un brevet [Felden, 2015].



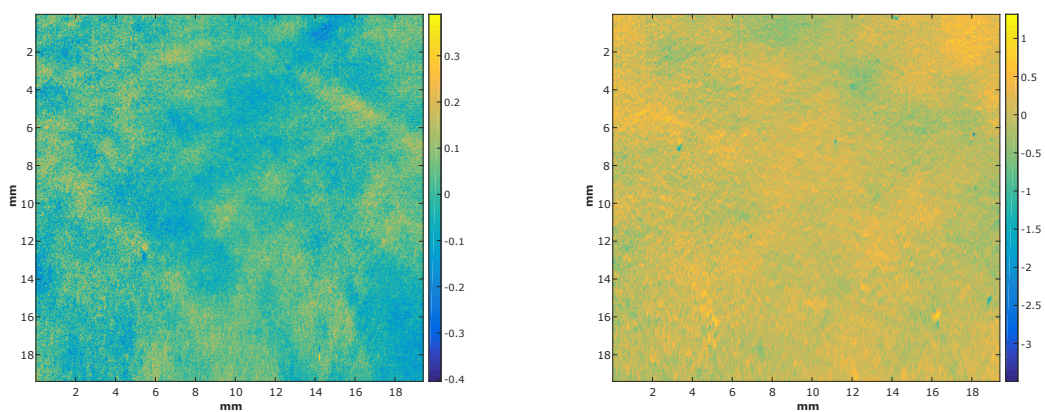
(a) Image brute, HA

(b) Image brute, HV



(c) Zone d'intérêt brute, HA

(d) Zone d'intérêt brute, HV



(e) Zone d'intérêt pré-traitée, HA

(f) Zone d'intérêt pré-traitée, HV

Figure 4.1 – De l'acquisition aux données prêtes pour la détection. Les deux types de membrane sont présentés. Dans les deux cas, des artefacts sont présents sur la surface. Pour la membrane HV, on remarque même des structures ponctuelles organisées en lignes obliques. Elles apparaissent sur la membrane pendant sa fabrication, quand celle-ci est mise à sécher sur des tambours micro-perforés.

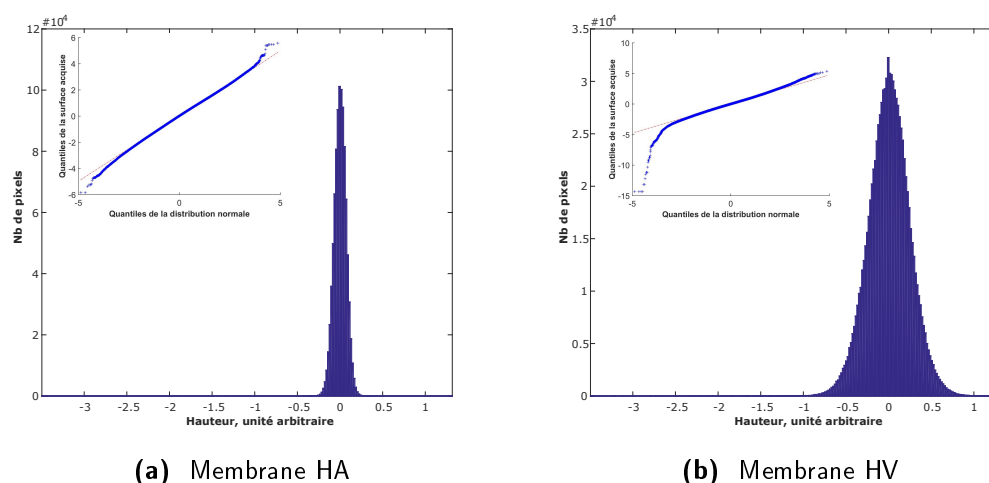


Figure 4.2 – Histogrammes correspondant à la distribution des mesures de hauteur pour chacune des deux membranes. En encart, comparaison quantile-quantile entre ces distributions (centrées et réduites) et la distribution gaussienne standard.

Le cas de la membrane et de son support est à traiter différemment. La membrane est scellée et tendue dans le dispositif. Cependant, celle-ci est détendue lors de la filtration et du rinçage, et prend la forme de son support. Dans certains cas, des bulles apparaissent, qui, si elles sont trop grandes, se transforment en plis sous l'effet de la pression présente dans le dispositif. Toutes ces configurations sont illustrées en Fig.4.3. Diverses solutions techniques ont été testées au cours du développement du produit afin de réduire ces marquages. Différentes formes de drain, protocoles de filtration ou vitesses de filtration ont par exemple été expérimentés. Cependant, aucune configuration ne garantit complètement ni de manière robuste l'absence de ces artefacts. Ils doivent donc être pris en compte dans l'élaboration de l'algorithme de détection. Nous savons tout de même que ces marquages n'évoluent pas ou peu pendant l'incubation.

Nous connaissons à présent les données à traiter, et nous savons que nous devons détecter des colonies correspondant à des pics dans ces données. Nous pouvons donc dans la section suivante étudier les différentes méthodes qui nous permettraient de parvenir à ce résultat.

4.2 État de l'art

En traitement d'images, les objets à détecter sont variés et plus ou moins complexes. Cela peut être un contour, un cercle, une texture, une voiture, un visage, une galaxie, une tumeur ou un bâtiment. Les buts de la détection sont également multiples, que ce soit pour détecter une présence, une absence, compter des objets, les suivre d'une image à une autre ou les mesurer. La méthode de détection dépend donc du contexte. Globalement, détecter un objet dans une image suit toujours le même processus :

1. Pré-traitements : afin de supprimer le bruit ou des signaux liés à l'acquisition ou au fond, qui sont présents dans les acquisitions.
2. Extraction de caractéristiques : ces caractéristiques peuvent être tout simplement la valeur

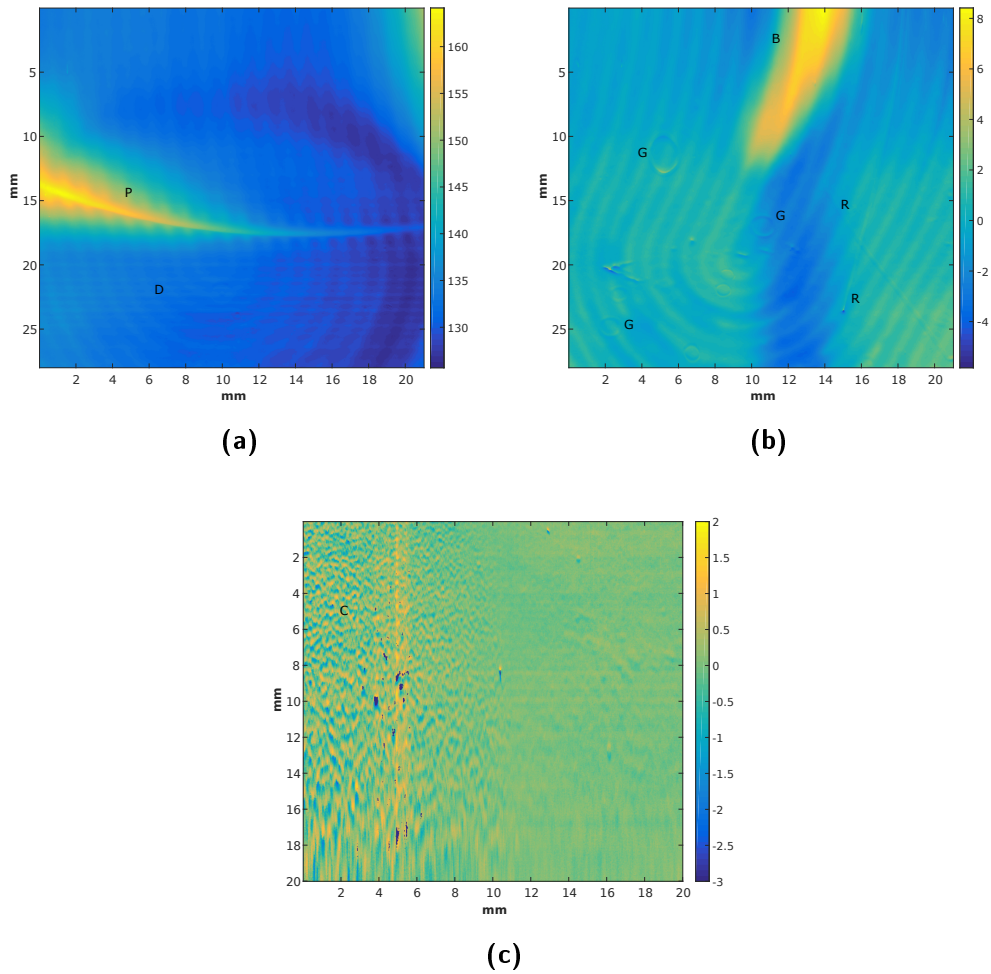


Figure 4.3 – Présentation des différents artefacts sur membrane HA : marquage du drain (D) en forme de 'U' concentriques, effet d'un pli (P), signal correspondant à une goutte (G) sur le couvercle ou à une rayure (R) et enfin élévation marquée liée à la présence d'une bulle d'air (B) emprisonnée sous la membrane. Pour l'image (c), la partie gauche du couvercle est couverte de condensation (C), ce qui empêche de distinguer la membrane en dessous. La trainée jaune est un artefact provenant des pré-traitements appliqués et causé par la buée. Les acquisitions (a) et (b) ont été faites dans le dispositif de l'application et l'acquisition (c) avec une boîte de Petri, ce qui explique l'absence de marquage en U.

des pixels (couleurs, niveaux de gris) mais également des objets simples (contour, coins, lignes), des paramètres statistiques (moyenne, variance, ...). Elles peuvent être issues d'une modélisation des données et donc correspondre aux paramètres de ce modèle ou à des mesures faites sur le modèle.

3. Réduction de dimension : l'utilité de cette étape dépend des situations, et dans notre cas, elle n'est pas nécessaire. Si les données sont de grande dimension, elle consiste à les représenter dans un espace plus restreint, soit grâce à une transformation des données, soit en sélectionnant certains descripteurs d'intérêt qui seraient les plus discriminants.
4. Détection : But final de l'algorithme, cette étape consiste à observer les données pré-traitées, extraites et éventuellement réduites pour y trouver les objets recherchés.

4.2.1 Les différents contextes de l'apprentissage

Dans notre cas, les pré-traitements ont été présentés dans la section précédente (Sect.4.1). De plus, nous disposons au minimum de deux acquisitions par membrane. Nous savons que des artefacts sont présents dans les données et nous comptons sur la comparaison de ces deux acquisitions pour les empêcher de créer des faux positifs. Par ailleurs, en regardant les données, nous constatons que les colonies sont très petites par rapport à la taille de la membrane. De plus, les cas où l'échantillon est en effet non-stérile sont peu fréquents, de l'ordre de un pour mille voire moins. Ce sont donc des événements rares, pouvant s'apparenter à des comportements aberrants (aussi appelés défauts, anomalies ou comportements anormaux dans la littérature). La détection de ce genre de comportement est un vaste sujet. Il concerne par exemple le filtrage de données en provenance de capteurs, de sondages, de données financières ou la détection de comportements anormaux, que ce soit un utilisateur sur internet, un bateau en pleine mer ou un individu dans le tramway.

Hodge et Austin [2004] proposent de classer les méthodes permettant la détection d'anomalies en trois familles, selon les données qu'elles utilisent pour l'étape d'apprentissage. La première concerne la détection dite non-supervisée. Dans ce cas, aucune information n'est disponible sur les données. Ces dernières sont comparées entre elles, et les plus éloignées ou les plus rares sont étiquetées comme étant des anomalies. Cette famille suppose donc que les données anormales soient suffisamment différentes des données normales. De plus, afin de démarrer l'analyse, il faut disposer d'un nombre d'échantillons important.

Le second cas regroupe les méthodes dites supervisées. Au contraire ici des informations a priori sont disponibles, à la fois sur les cas normaux et sur les anomalies. Il est donc possible de se servir de ces informations pour l'étape d'apprentissage. Ce dernier est réalisé sur un petit nombre d'échantillons représentatifs appartenant aux deux cas. Cela permet d'obtenir une cartographie des données et des anomalies basée sur les caractéristiques disponibles.

Cependant, le plus souvent, les données à détecter ne sont pas connues. Des informations sur le fonctionnement normal du système sont disponibles, mais il est plus compliqué de s'en procurer sur les dysfonctionnements. Il est en effet difficile de connaître ou de prévoir tous les modes d'erreurs. Par ailleurs, il est aussi nécessaire de conserver un système adaptable capable de détecter une erreur qui ne s'est jamais produite auparavant. Dans cette situation, la troisième

famille de méthodes est la plus adaptée, à mi-chemin des deux précédentes et appelée semi-supervisée. Elle correspond à une situation où l'apprentissage ne tient compte que des données normales : une seule classe est connue et tout ce qui n'appartient pas à cette classe est une anomalie.

Dans notre application, nous savons que les événements à détecter sont les colonies de micro-organismes, mais nous n'avons aucune information a priori sur la souche qui se développe. De plus, il n'est pas rare de constater en microbiologie qu'une même souche voit sa couleur ou sa forme évoluer. Ces changements sont liés à l'environnement dans lequel la colonie se développe (membrane, milieu de culture, température), mais aussi à ce qu'elle a enduré auparavant (survie durant le processus de fabrication puis dans l'échantillon, traitement lors de la préparation du test de stérilité). Pour créer un système robuste, nous considérons donc que nous ne connaissons rien a priori sur les événements à détecter et étudions les méthodes de détection d'anomalies semi-supervisées.

Il est à noter que certaines méthodes peuvent être adaptées en fonction des besoins à l'un ou l'autre des cas, et appartiennent donc à plusieurs de ces trois familles.

4.2.2 Les différentes techniques de détection

Une seconde façon de catégoriser les méthodes de détection est de se baser sur la technique utilisée, comme le proposent Kriegel *et al.* [2010], et non plus sur les données utilisées pour l'apprentissage. Les catégories répertoriées sont les approches basées sur un modèle, celles basées sur les angles et celles basées sur la proximité des données.

Méthodes basées sur la modélisation

La première catégorie regroupe les méthodes qui modélisent les données normales. Elle concerne en premier lieu la modélisation statistique des données suivie d'un test probabiliste pour déterminer l'appartenance d'une donnée au modèle. C'est ce que propose Laxhammar [2008], qui ajuste un mélange de gaussiennes pour décrire les données. Les paramètres de ce mélange sont estimés par un algorithme EM glouton. Il se découpe en deux étapes répétées de manière itérative. La première consiste à calculer l'espérance (E) qu'a chaque point d'appartenir à chaque composante du mélange (ici des gaussiennes). Ces valeurs sont utilisées lors de la seconde étape pour évaluer les paramètres du mélange qui maximisent (M) la vraisemblance entre les données et le modèle. La version gloutonne de cet algorithme procède par étape en optimisant pour commencer les paramètres d'un modèle ne comportant qu'une seule composante, puis en ajoutant au fur et à mesure des composantes. Des critères de convergence sont appliqués pour stopper les itérations. Une fois le modèle estimé et pour chaque point à classer, un critère d'appartenance est évalué en se basant sur la vraisemblance qu'a cet élément d'appartenir au modèle. D'autres modèles peuvent être utilisés, comme une simple distribution gaussienne, ainsi que de nombreux tests. Une de ces alternatives est présentée dans la section suivante (Sect.4.3).

Un second cas de cette catégorie est une approche basée sur la profondeur, qui suppose que les données sont bien regroupées et que les anomalies sont au bord de ce groupe. Les données sont modélisées par différentes enveloppes convexes en partant du centre et imbriquées les unes dans les autres (Fig.4.4). Les données anormales sont sur l'enveloppe la plus externe.

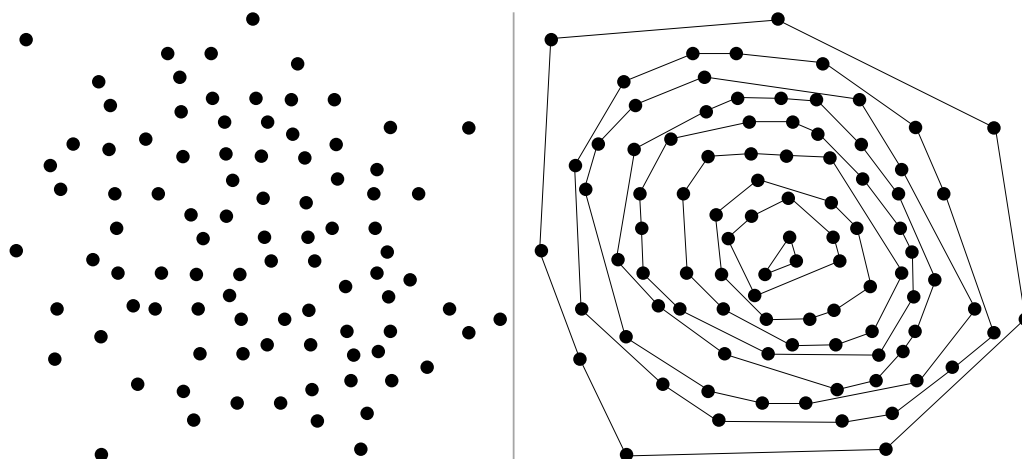


Figure 4.4 – Principe de détection de données aberrantes basé sur l'utilisation d'enveloppes convexes pour trier les données.

Un troisième et dernier cas de cette catégorie utilise la variance. Une façon de procéder est de retirer les échantillons un à un et d'observer comment cela impacte la variance. Si celle-ci varie fortement, la donnée est une anomalie.

Méthodes basées sur les angles

La seconde catégorie regroupe les méthodes qui évaluent les angles entre les données [Kriegel *et al.*, 2008]. Le principe général de cette catégorie est décrit Fig.4.5. Un objet est une anomalie s'il voit tous les autres objets dans des directions proches. Dans le cas contraire, les objets sont répartis dans toutes les directions autour de l'individu évalué. Cette méthode n'a pas été étudiée plus en détail au cours de notre travail, mais elle pourrait faire l'objet de tests dans le futur, par exemple si les descripteurs utilisés venaient à être plus nombreux. Les angles sont en effet plus stables que les distances dans des espaces de grande dimension.

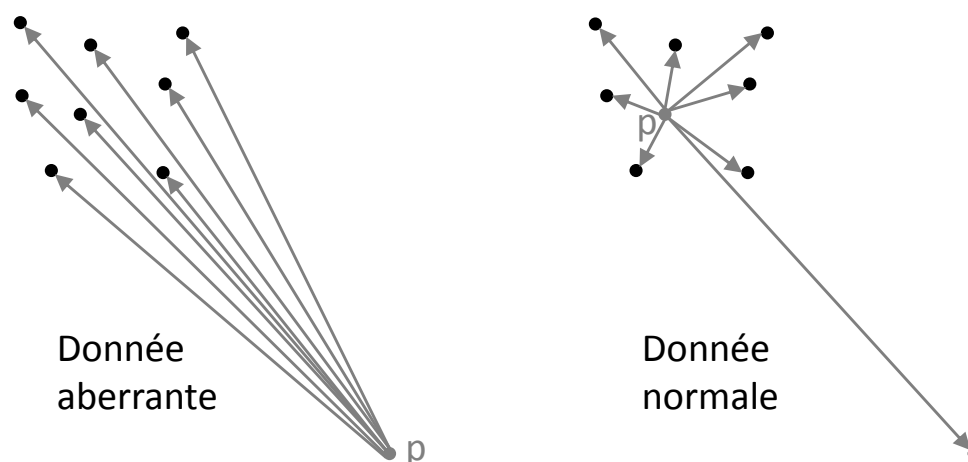


Figure 4.5 – Principe de détection de données aberrantes basé sur la mesure des angles de vue des objets les uns par rapport aux autres.

Méthodes basées sur la proximité

La troisième et dernière catégorie concerne les méthodes basées sur la proximité. Elles évaluent la distance entre les données ou la densité de celles-ci. Dans le cas de l'évaluation de la distance entre les objets, il est par exemple possible de se baser sur le dénombrement des objets situés dans un voisinage de l'individu à classer, ce voisinage pouvant être défini comme l'ensemble des points dont la distance à l'individu est inférieure à un seuil fixé. Une anomalie aura peu de voisins, donc obtiendra une valeur faible. Il est également possible de considérer comme score la distance du $k^{\text{ème}}$ plus proche voisin. Concernant la densité, elle est le plus souvent calculée pour chaque donnée à classer en utilisant la distance entre celle-ci et ses plus proches voisines. Le paramètre de densité le plus connu s'appelle le LOF (*Local Outlier Factor*) [Janssens *et al.*, 2009], mais il en existe d'autres, par exemple basés sur une description des données en terme de kNN (*k-Nearest Neighbors*, plus proches voisins) [Janssens *et al.*, 2009]. La densité peut également être estimée sans évaluer les distances entre les points. Dans ce cas, elle est par exemple obtenue directement en se basant sur une méthode à noyaux (KDE : *Kernel Density Estimation*) [Schubert *et al.*, 2014].

Pour aller plus loin

Une méthode hybride entre les catégories une et trois est donnée par Subramaniam *et al.* [2006]. Ils proposent une méthode hybride où les données sont modélisées en utilisant des estimateurs à noyaux. La densité est ensuite calculée par rapport au modèle estimé et non par rapport aux données. Elle est utilisée comme critère d'appartenance au modèle. Cette méthode requiert de considérer un nombre important de voisins (supérieur à 15), ce qui implique d'avoir un jeu de données conséquent, or ce n'est pas notre cas.

Enfin, des algorithmes s'inspirant des SVMs (*Support Vector Machine*, séparateur à vaste marge) sont également utilisés pour détecter les données aberrantes. Ce sont les SVMs à une seule classe : une frontière est estimée pour délimiter les données d'apprentissage connues ('normales') des données aberrantes. Elles sont appelées SVDD (*Support Vector Domain Description*) par Janssens *et al.* [2009].

Il existe par ailleurs des méthodes permettant d'agréger les résultats de plusieurs détecteurs dans le cas particulier de la détection de données aberrantes. Celle décrite par Lazarevic et Kumar [2005] reprend toujours le même détecteur en faisant varier les caractéristiques sélectionnées, afin d'augmenter la robustesse du résultat.

Nous proposons, dans la suite de l'état de l'art, de nous intéresser plus particulièrement aux deux catégories restantes, les méthodes basées sur un modèle et les méthodes basées sur la proximité.

4.3 Présentation d'une méthode basée sur un modèle

4.3.1 Les champs aléatoires gaussiens

La thématique des méthodes basées sur la modélisation des données a été traitée et développée par le Dr Ola Ahmad dans le cadre d'un contrat post-doctoral conjoint à cette thèse. L'approche

choisie s'inspire des travaux réalisés par exemple dans le domaine de l'ingénierie des surfaces et en particulier concernant l'étude de leur rugosité [Ahmad *et al.*, 2015]. Cette méthode est non-supervisée, mais repose sur certaines hypothèses concernant les caractéristiques des objets à détecter. Nous avons déjà vu que la distribution des données acquises correspondant à la topographie de la surface de la membrane peut être considérée comme gaussienne. En réalité, celle-ci peut même être assimilée à un champ aléatoire gaussien [Adler, 1981] en l'absence de colonie (hypothèse H_0). Nous définissons cette structure mathématique dans le cas qui nous concerne, en 2 dimensions. Pour chaque pixel $x \in S$, où $S \in \mathbb{R}^2$ est le support de l'image, la valeur $Z(x)$ correspond à la hauteur du profil en x . Alors $Z(x) : x \in S$ est un champ aléatoire gaussien si quels que soient x_1, x_2, \dots, x_n et quel que soit n , les hauteurs $Z(x_1), Z(x_2), \dots, Z(x_n)$ suivent une fonction de distribution gaussienne multivariée dont la probabilité est donnée par l'Eq.4.1, où $\mu = E[z]$ et C est la matrice de covariance de taille $n \times n$ définie non-négative (ou semi-positive) dont les éléments sont les $C_{ij} = E[(Z(x_i) - \mu_i)(Z(x_j) - \mu_j)]$ et dont le déterminant est noté $|C|$. Un exemple simulé de champ aléatoire gaussien est donné Fig.4.7a.

$$f_Z(z) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{n}{2}} |C|^{\frac{1}{2}}} e^{-\frac{1}{2}(z-\mu)C^{-1}(z-\mu)^t} \quad (4.1)$$

La Fig.4.6b présente les valeurs de la caractéristique d'Euler pour nos données (Fig.4.6a) et celles d'une distribution gaussienne. Cette caractéristique reflète la structure de la topographie, puisqu'elle est liée, pour le cas d'un ensemble seuillé, au nombre de composantes connexes moins le nombre de trous de cet ensemble [Adler et Taylor, 2007]. Cela permet de réaliser un test d'adéquation de nos données avec un modèle gaussien et prend en compte la corrélation entre les valeurs des pixels, puisqu'elle dépend des dérivées de la fonction de covariance. Puisque les deux courbes sont relativement bien ajustées, il est raisonnable de modéliser nos données par un champ gaussien aléatoire. La différence constatée est liée aux valeurs extrêmes, dont l'écart au modèle gaussien est visible également sur le diagramme de comparaison des quantiles Fig.4.6c.

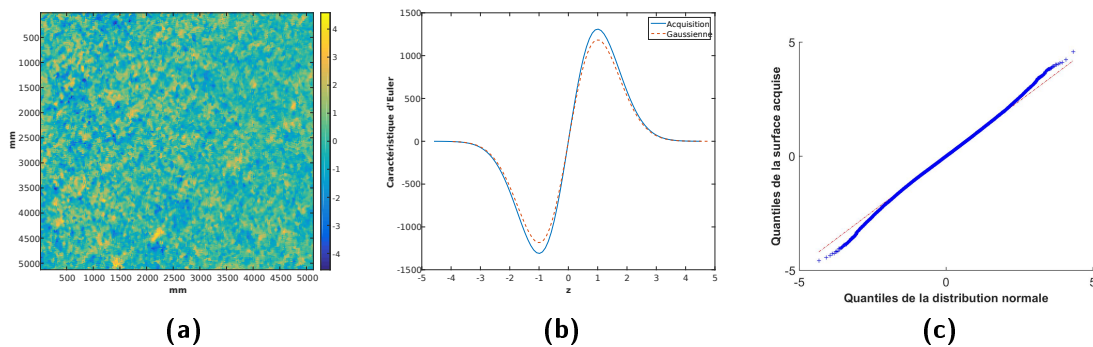


Figure 4.6 – Étude du caractère gaussien des données acquises. Celui-ci est également confirmé par l'étude des moments d'ordre 3 et 4 sur des données en l'absence de colonies. Pour la membrane HA présentée ici, le coefficient de dissymétrie (*skewness* en anglais) vaut -0.03 et le kurtosis 3.33 . Pour la membrane HV, les valeurs obtenues sont respectivement de -0.11 et de 3.18 . En les comparant aux valeurs attendues pour une densité de probabilité gaussienne, qui sont respectivement de 0 et de 3 , le modèle gaussien semble en effet adapté.

Le seuillage du champ aléatoire gaussien modélisé permet de créer un sous-ensemble $A_z(Z, S) = x \in S : Z(x) > z$, où $Z(x), x \in S$ que nous appellerons ensemble seuillé (*excursion set* en an-

glais) de seuil z du champ aléatoire gaussien Z dans S . Cet ensemble est composé de groupes de pixels dont la taille varie en fonction du seuil. Les Figs.4.7b et 4.7c présentent deux exemples donnés pour des seuils différents.

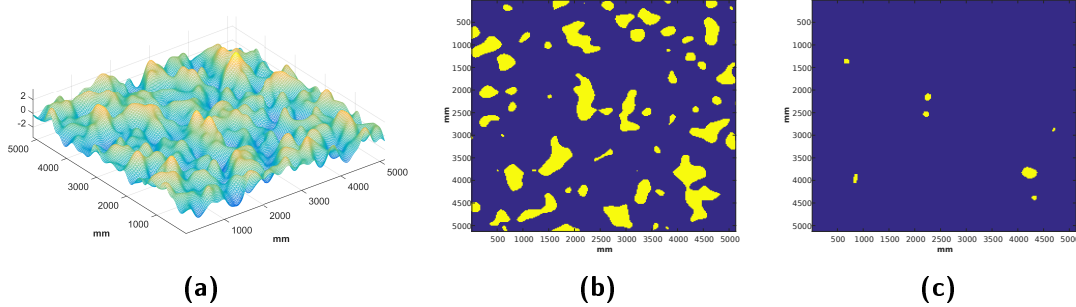


Figure 4.7 – Simulation d'un champ gaussien et visualisation de deux ensembles seuillés, pour $z = 1$ et $z = 2.5$. Les composantes connexes correspondant aux maxima sont en jaune.

4.3.2 Utilisation de la caractéristique d'Euler

Puisque les colonies correspondent à des pics dans les données de hauteur, il est raisonnable de considérer que certaines des composantes connexes appartenant à l'ensemble seuillé sont les objets que nous souhaitons détecter. Dans un premier temps, une méthode automatique pour estimer un seuil pertinent est mise en œuvre. Le but est de trouver la valeur critique pour z pour laquelle la probabilité de trouver des pixels dans des composantes connexes appartenant au champ gaussien est significative. C'est-à-dire pour l'application qui nous concerne, que cette probabilité est inférieure ou égale à 0.05. Cela correspond à trouver la valeur de z pour laquelle $P(Z \geq z) \leq 0.05$. Or il a été démontré que l'espérance de la caractéristique d'Euler d'un sous ensemble pour un seuil élevé est une bonne approximation de cette probabilité [Adler, 1981]. Cette espérance de la caractéristique d'Euler est donnée par l'Eq.4.2 en dimension 2 [Nosko, 1986], où $\lambda(S)$ correspond à la surface de l'image (S), et $|\Lambda|$ est le déterminant de la matrice de variance-covariance des dérivées partielles du champ aléatoire gaussien : $\Lambda = \text{Var}(\partial Z/\partial x)$. La probabilité $P(Z \geq z)$ peut donc être exprimée comme dans l'Eq.4.3.

$$E[\chi(A_z(Z, S))] = \lambda(S)(2\pi)^{-3/2}|\Lambda|ze^{-z^2/2} \quad (4.2)$$

$$P(Z \geq z) = E[\chi(A_z(Z, S))] = \lambda(S)(2\pi)^{-3/2}|\Lambda|ze^{-z^2/2} \quad (4.3)$$

4.3.3 Évaluation de la pertinence des objets détectés par un test statistique

Afin de différencier les colonies d'autres événements, une étude statistique est réalisée sur l'ensemble seuillé. Chaque composante connexe de l'ensemble seuillé est examinée en évaluant deux critères. Le premier est lié à la hauteur du pic et le second à son étendue. Ces deux critères sont exprimés sous forme de probabilité et celle-ci est comparée à un seuil d'erreur ϵ fixé à 1%, en accord avec le cahier des charges initial. Les expressions de ces probabilités, données ci-dessous (Eqs.4.4 et 4.5), sont déduites de Friston *et al.* [1994] et de Poline *et al.* [1997].

Nous avons montré que la membrane en l'absence de colonie peut être modélisée par un champ gaussien. Dans le cas contraire, en présence de colonie, les données dévient localement de ce modèle, en prenant, dans le cas des colonies, des valeurs trop hautes. L'appartenance au modèle de chaque composante connexe est donc testée en évaluant la probabilité $P(h \geq h_0)$ qu'a chacun de ses pixels de dépasser une valeur critique. Cette probabilité est donnée par l'Eq.4.4, où $z + h_0$ est la valeur maximale de la composante connexe considérée. Si la probabilité trouvée est inférieure ou égale à ϵ , les pixels considérés n'appartiennent pas au champ gaussien, ils forment un pic prononcé et correspondent donc à une colonie.

$$P(h \geq h_0) = \frac{E[\chi(A_{z+h_0}(Z, S))]}{E[\chi(A_z(Z, S))]} = \left(1 + \frac{h_0}{z}\right) e^{-zh_0 + h_0^2/2} \quad (4.4)$$

Avec un tel critère, certaines colonies ne se développant pas en hauteur pourraient être manquées. Il faut donc que le second critère permette la discrimination des colonies qui croissent à la surface en s'étendant plus qu'en s'élevant. De la même manière que pour la hauteur, il s'agit ici d'évaluer la probabilité $P(s_z \geq s_0)$ que l'aire d'une composante connexe soit supérieure à un seuil préalablement fixé. D'après Nosko [1986], si z est suffisamment grand, la distribution conditionnelle de la taille d'une composante connexe suit une loi exponentielle. Friston *et al.* [1994] en a déduit l'approximation de la taille s_z moyenne d'une composante connexe : $E[s_z] = \lambda(S)\Phi(-z)/E[m_z]$ où $E[m_z] \approx E[\chi(A_z(Z, S))]$ et où $\lambda(S)\Phi(-z)$ correspond à l'aire moyenne de l'ensemble seuillé. La probabilité $P(s_z \geq s_0)$ peut alors être exprimée comme dans l'Eq.4.5. Ici également, la composante connexe est considérée comme une colonie si la probabilité trouvée est inférieure à ϵ .

$$P(s_z \geq s_0) \approx E[s_z] = e^{-\beta s_0}, \text{ où } \beta = \frac{(2\pi)^{-3/2} |\Lambda|^{1/2} z e^{-z^2/2}}{\Phi(-z)} \quad (4.5)$$

La détection décrite jusqu'ici ne permet pas de différencier entre les colonies et des résidus ou autres artefacts semblables aux colonies. Cette méthode est donc appliquée séparément sur les deux acquisitions, puis les objets sont comparés un à un, grâce à leur position. L'Algo.1 résume toutes les étapes de cette détection.

La méthode présentée a été développée sur des données acquises au début de la thèse, avec le capteur Keyence à laser. Des résultats avec des données provenant du système d'acquisition final sont présentés au Chap.5. Ces résultats serviront de référence pour l'évaluation de la méthode que nous avons développée et qui est l'objet de la section suivante. Si les méthodes basées sur un modèle sont écartées, il reste à évaluer les méthodes basées sur la densité exprimée à l'aide des distances entre voisins, kNN et LOF, et les méthodes utilisant les SVMs.

4.4 Choix d'une méthode basée sur la proximité ou sur la SVDD

Avant de tester les différentes méthodes, nous décrivons les images synthétiques représentatives des acquisitions créées pour ces tests. Nous évoquons ensuite le choix de descripteurs sur nos images. Nous présentons finalement les tests et les résultats de la méthode retenue sur les

Algorithme 1 Champs aléatoire gaussien.

Require: Images acquises T_0 et T

$\epsilon = 0.01$

▷ Taux d'erreur
▷ Détection

for all Images acquises **do**

Estimer z grâce à l'Eq.4.3

Détecter les composantes connexe au seuil z

for all composantes connexes **do**

Calculer $P1 = P(h \geq h_0)$ (Eq.4.4)

Calculer $P2 = P(s_z \geq s_0)$ (Eq.4.5)

Conserver la composante connexe si $P1 < \epsilon$ ou $P2 < \epsilon$

end for

end for

▷ Comparaison

for all composantes connexes restantes dans l'image T **do**

Comparer aux composantes connexes restantes dans l'image T_0

Conserver celles présentes uniquement à T

end for

images synthétiques.

4.4.1 Données synthétiques

Les tests pour évaluer les différentes méthodes sont réalisés sur des données synthétiques. Nous avons créé des images de taille 50x50 ayant une distribution normale. Ces images correspondent au T_0 et au cas négatif où rien n'a poussé (Figs.4.8a et 4.8d). La présence d'une colonie est simulée par une gaussienne à deux dimensions. Les paramètres de variance sont augmentés ou diminués pour faire varier la taille des colonies. Des objets (particules) sont simulés par des gaussiennes similaires à celles utilisées pour les colonies (Figs.4.8b et 4.8e). La différence est donc, comme dans le cas réel, que celles-ci ne sont présentes qu'à T .

Malgré toutes les précautions prises, certaines acquisitions faites lors des tests avec micro-organismes présentent une translation des données le long de l'axe d'acquisition. Il faut donc que l'algorithme soit robuste à cette translation. Des données synthétiques correspondant à ce cas sont donc également créées (Figs.4.8c et 4.8f).

4.4.2 Choix de descripteurs

La première idée, probablement la plus simple, est d'utiliser les pixels de l'image comme descripteurs. Par exemple les pixels de T_0 , puis de T ou la différence entre les deux. Cependant, cette approche serait peu robuste et ne permettrait pas de résoudre le problème lié au décalage des données entre les deux acquisitions. Nous avons donc choisi de considérer des blocs de pixels. Se posera la question de la taille des blocs, qui devra être du même ordre de grandeur que les décalages observés, sans être trop grande par rapport aux colonies. Cela donne une taille de bloc entre 5x5 et 20x20 pixels. Différentes statistiques sur ces blocs peuvent être utilisées, comme la médiane, le minimum, le maximum, l'écart-type, l'entropie ou des mesures sur les blocs comme la corrélation ou la distance entre les blocs de T_0 et de T .

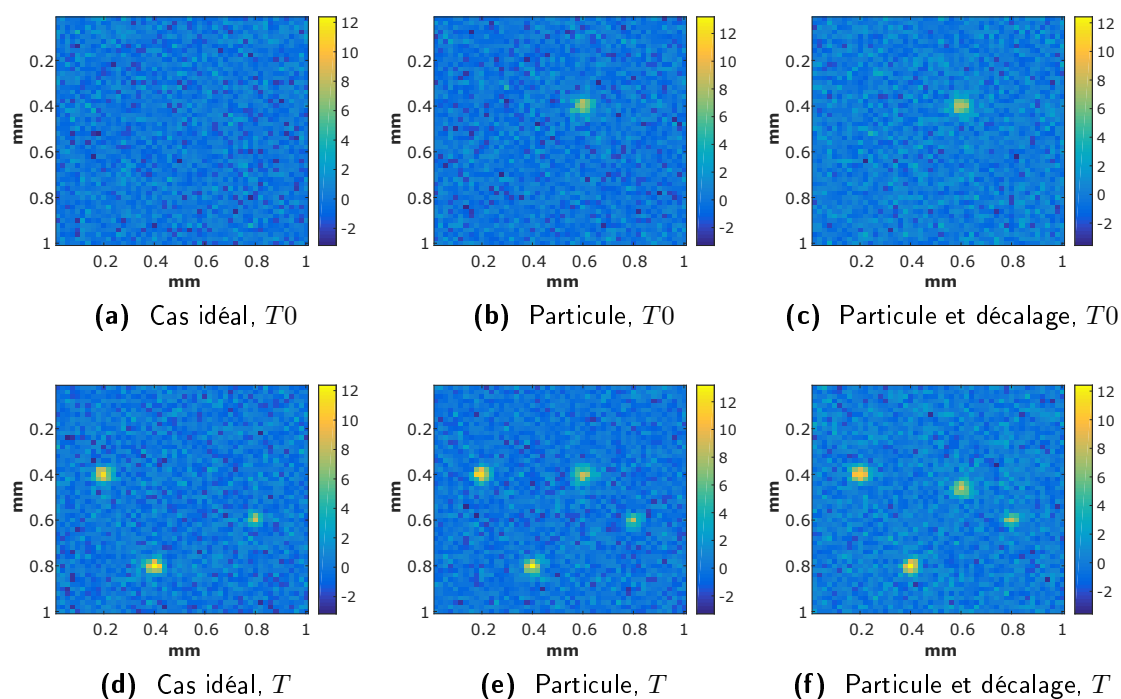


Figure 4.8 – Présentation des données synthétiques utilisées, 3 cas représentatifs sont créés. Au temps T , des colonies apparaissent.

Dans un premier temps, nous visualisons simplement les métriques deux à deux afin de trouver des configurations qui permettent la meilleure séparation des données. Nous faisons également varier la taille des blocs (carrés de 5, 11, 17 et 23 pixels de côté). Les descripteurs les plus pertinents identifiés pour discriminer les pixels correspondant aux colonies sont le maximum et l'écart-type. Cela vient du fait que les colonies, même si certaines ont tendance à s'étaler, grandissent en hauteur par rapport à la surface de la membrane. Concernant la taille des blocs, les deux plus petites tailles testées donnent les meilleurs résultats. Pour la suite nous utiliserons donc des blocs de taille 3, 5 et 7 pixels, ce qui est proche de la taille des colonies dans le cadre d'une détection précoce.

Réaliser la détection des colonies en se basant sur le changement $T0/T$ du maximum ou de l'écart-type par bloc est performant dans le cas idéal, mais peu robuste à la présence de contaminants et encore moins au décalage des données si celui-ci est très important. Nous avons donc choisi d'ajouter la position des pixels en tant que descripteurs. Cela ajoute 2 dimensions à notre problème puisque nous utilisons les coordonnées (ligne et colonne) des pixels dans l'image.

4.4.3 Test des méthodes basées sur le LOF, les kNN et les SVM

En travaillant toujours avec les données synthétiques, les trois méthodes de détection retenues sont testées. Elles sont paramétrées de manière empirique auparavant. Les expériences ont permis de montrer que la taille de blocs la plus adaptée aux données synthétiques est de 5 pixels. Nous ne présentons donc les résultats que pour ce paramètre. D'après le Tab.4.1, utiliser le descripteur correspondant au maximum par bloc est plus performant que l'écart-type. Cela vient du fait qu'à

l'échelle d'un bloc, le maximum est local (un seul pixel) alors que l'écart-type est global (tous les pixels du bloc). Les trois méthodes évaluées se valent, mais le SVM ne donne pas le résultat le plus optimal. Il est plus difficile de départager le LOF du kNN en regardant les résultats obtenus avec le maximum. Le LOF étant un peu plus performant de manière générale [Janssens *et al.*, 2009], cette solution est retenue pour la suite des tests.

Descripteurs	Méthode	I	C	T
Pos+max	LOF	3	3	3
	kNN	3	3	3
	SVM	3	3	4
Pos+ σ	LOF	3	3	4
	kNN	2	2	2
	SVM	3+a	3+a	4+a

Table 4.1 – Résumé des résultats des tests des différentes méthodes sur des données synthétiques idéales (I), avec particule (C) et décalées (T). Deux jeux de descripteurs sont utilisés, la combinaison position+maximum par bloc et la combinaison position+écart-type par bloc (σ). Les données présentent toutes 3 colonies à T . Les valeurs dans le tableau indiquent le nombre de colonies détectées. Une valeur différente de 3 correspond donc à une erreur de détection. Les cas signalés par un a correspondent à des effets de bord conduisant à des détections. Ceux-ci pouvant être traités, ils ne sont pas pris en compte dans l'évaluation.

4.4.4 Mise en œuvre du LOF et résultats sur les données synthétiques

Le calcul du LOF dans le cadre de la détection de données aberrantes consiste, pour chaque pixel x_i à classer, à définir son voisinage $N(x_i, k)$ comme étant l'ensemble des données d'apprentissage dont la distance par rapport à ce pixel est inférieure ou égale à la distance d_f de son $k^{\text{ème}}$ voisin. Pour chaque voisin, sa distance d'accessibilité $d_a(x_i, x_j, k)$ est définie comme étant soit la distance de ce voisin avec son $k^{\text{ème}}$ voisin, soit la distance entre ce voisin et le pixel considéré, selon celle qui est la plus grande. Il est alors possible de définir la mesure de dissimilarité du LOF ($\delta_{LOF}(x_i, k, Z_{T0})$) (Eq.4.6), où l'on note $|X|$ le cardinal de X . Dans le cas d'un apprentissage semi-supervisé pour la détection d'anomalies, les voisins sont choisis dans les données d'apprentissage Z_{T0} , et les x_i à classer sont dans Z_T .

$$\delta_{LOF}(x_i, k, Z_{T0}) = \frac{\sum_{x_j \in N(x_i, k)} \frac{\rho(x_j, k)}{\rho(x_i, k)}}{|N(x_i, k)|} \quad (4.6)$$

où :

$$\rho(x_n, k) = \frac{|N(x_n, k)|}{\sum_{x_n \in N(x_i, k)} d_a(x_i, x_n, k)} \quad (4.7)$$

Le schéma de la Fig.4.9 illustre la méthode de calcul du LOF pour un point à classer, x_i . Le résultat sera proche de 1, puisque ce point est proche de ses voisins. Ils ont donc des densités ρ similaires. Les ratios dans la formule de la dissimilarité seront proches de 1, et donc le LOF également.

Pour réaliser la détection, il suffit de calculer la valeur du facteur LOF en chaque pixel. Il faut ensuite seuiller le résultat obtenu pour ne garder que les pixels dont le LOF est le plus grand,

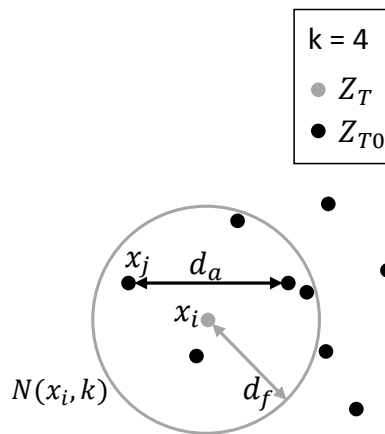


Figure 4.9 – Schéma d’explication de la méthode de calcul du LOF. L’exemple est donné pour un nombre de voisins $k = 4$ et calculé pour le point à classer x_i (en gris) par rapport aux points d’apprentissage (en noir). Le LOF pour le point considéré sera autour de 1.

ce qui correspond aux pixels qui ont le plus changé. Pour ce faire, nous ajoutons un seuillage suivant la méthode d’Otsu [Otsu, 1979], qui utilise la distribution des données de manière à les répartir en deux classes. Le seuil entre celles-ci est choisi de manière à minimiser les variances de ces deux classes. Le nombre de colonies dans l’image correspond alors aux composantes connexes ainsi détectées. Ces résultats sont présentés Fig.4.10. Les trois cas étudiés (le cas idéal, le cas avec une particule et le cas avec un décalage) donnent un résultat de détection conforme aux données. Les formes correspondant aux colonies ne sont pas toujours les mêmes à cause du bruit ajouté aux images synthétiques lors de la création.

Ce seuillage génère toutefois de nombreuses détections erronées, puisque même en l’absence de colonie, des pixels sont détectés. Ces pixels correspondent à du bruit dans l’image. Ce phénomène est illustré Fig.4.11 sur des données synthétiques négatives, c’est-à-dire ne présentant pas de colonie. Nous constatons en effet que les structures détectées dans la Fig.4.11d correspondent à des pixels particulièrement bruités dans les Figs.4.11a et 4.11b. D’après la Fig.4.11c seuls deux pixels atteignent un score de LOF vraiment proche de 1, l’un en bas à gauche (égal à 1) et l’autre tout en bas à droite (égal à 0.93). Ces pixels sont par ailleurs complètement isolés. La méthode d’Otsu séparant systématiquement les données en deux, le résultat est toujours positif. Il faut donc réaliser un tri parmi les données seuillées afin d’identifier les cas correspondant réellement à des micro-organismes. Intuitivement, nous avons choisi de discriminer les données en nous basant sur les pixels détectés. Nous ne considérons donc comme positif que les cas où la valeur moyenne et la variance de ces pixels sont suffisamment grandes. Nous avons donc défini deux seuils qui dépendent des données. Ce procédé fonctionne sur les données synthétiques, c’est-à-dire qu’il permet de détecter correctement les cas négatifs. Il est résumé dans l’Algo.2. Nous verrons dans le chapitre suivant (Chap.5) que cette méthode de tri doit être améliorée pour obtenir des performances satisfaisantes sur les données réelles.

Conclusion Dans ce chapitre, nous avons présenté une première méthode de détection des colonies basée sur la modélisation des données de hauteur par un champ aléatoire gaussien (dans la suite, nous appellerons cet algorithme CAG). Nous avons ensuite proposé une seconde

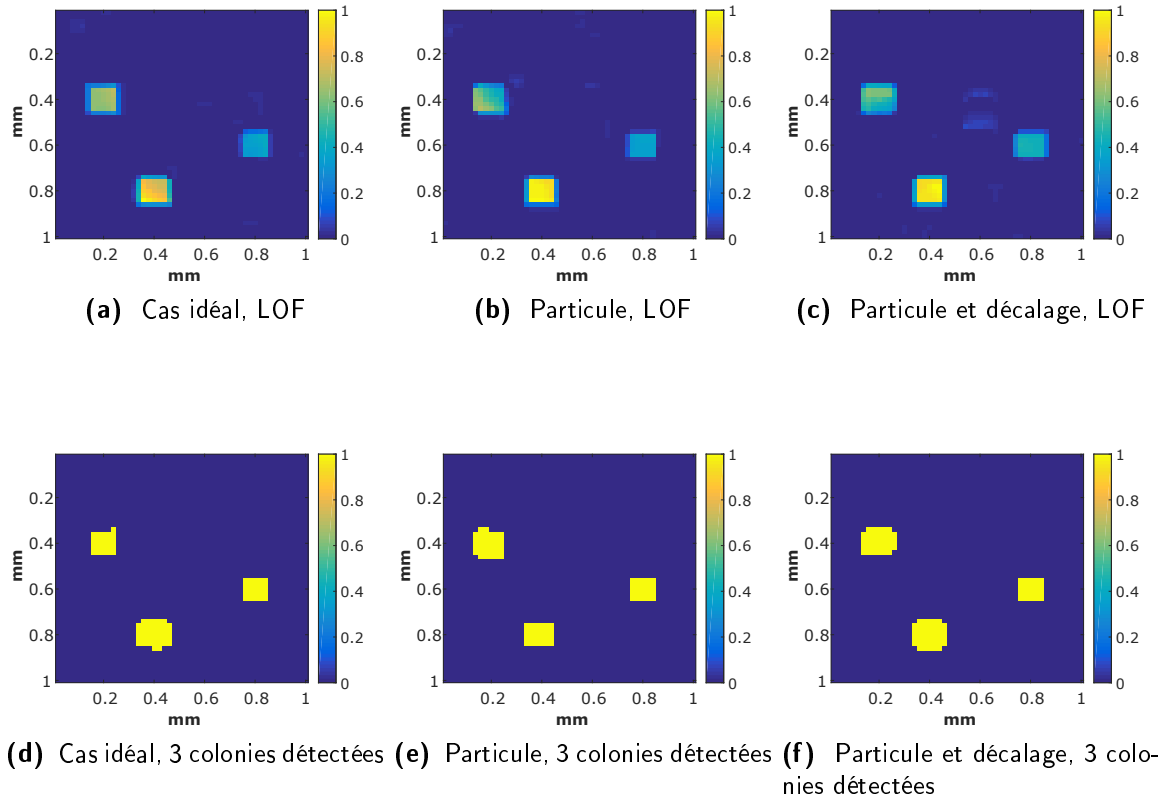


Figure 4.10 – Résultats sur les données synthétiques. En haut le calcul du LOF à partir des données du maximum par bloc (blocs de 5 pixels et pour $k = 5$ voisins) et en bas le résultat après le seuillage par la méthode d'Otsu. Dans tous les cas, la vérité terrain est de 3 colonies. On note que les résultats correspondent à la réalité et que la particule n'est pas détectée

Algorithme 2 Max, LOF, Otsu, Tri.

Require: Images acquises T_0 et T

$k = 9, s = 9$

$T_0, T = \text{preTraitement}(T_0, T)$

for i, j indices de l'image **do**

$M_{T_0}(i, j) = \max_s(T_0(i, j))$

 ▷ Calcul du max sur des blocs de taille s

$M_T(i, j) = \max_s(T(i, j))$

end for

$F = \text{LOF}([M_T, I, J], [M_{T_0}, I, J], k)$

▷ Calcul du LOF, $[I, J]$ positions des pixels

$R = \text{Otsu}(F)$

$C = \text{CCC}(R)$

▷ Compte les composantes connexes

$t2a = \frac{\text{card}(R=1)}{C}$

$t2b = \sigma(T(R = 0))$

Test sur les objets détectés.

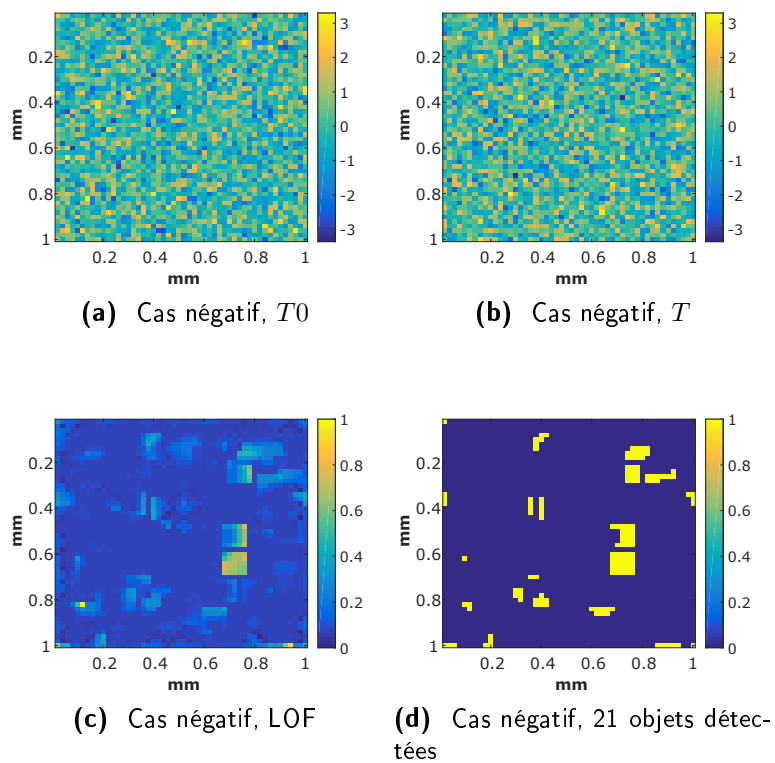


Figure 4.11 – Résultats sur les données synthétiques ne présentant pas de colonie. En haut les données et en bas le calcul du LOF à partir des données du maximum par bloc (blocs de 5 pixels et pour $k = 5$ voisins) et le résultat après le seuillage par la méthode d’Otsu. Le résultat présente de nombreux faux positifs.

méthode basée sur les mêmes données. Notre apport consiste à utiliser une méthode de détection de données aberrantes semi-supervisée, ce qui permet de rester très générique quant aux objets détectés. Nous discriminons en effet tout ce qui est différent de ce qui a été appris, c'est-à-dire l'acquisition à T_0 . Pour rendre cette méthode robuste par rapport au décalage entre les deux acquisitions, nous avons ajouté un traitement par bloc. De plus, pour discriminer les colonies de micro-organismes des autres événements (particules, résidus, ...), nous avons intégré la position des pixels dans les descripteurs utilisés pour la détection. Finalement, un seuillage par la méthode d'Otsu est réalisé sur les données de LOF pour détecter les objets. Ces derniers sont ensuite triés grâce à un nouveau seuillage pour valider la pertinence de la détection et réduire le nombre de faux positifs. Cette méthode doit à présent être utilisée sur des données réelles, ce qui constitue l'objet du chapitre suivant (dans la suite, nous appellerons cet algorithme MaLOT).

Chapitre 5

Données réelles : résultats et performances

Introduction Dans ce dernier chapitre, nous présentons les résultats de la détection sur des données acquises dans les conditions de l'application, au dispositif de filtration près. Nous commençons par décrire les données que nous utilisons pour tester les algorithmes (Sect.5.1). Nous montrons ensuite les résultats obtenus avec l'algorithme MaLOT, les améliorations apportées et les résultats de détection finaux (Sect.5.2). Les mêmes données sont ensuite utilisées avec l'algorithme CAG. Finalement, une discussion est proposée sur les performances obtenues avec les différentes méthodes (Sect.5.3).

5.1 Les données

Un jeu de données a été acquis pour tester les algorithmes. Les micro-organismes testés font partie de la liste présentée dans l'introduction (Tab.3). Trois micro-organismes ont été écartés. Le premier est *A. brasiliensis* car c'est une moisissure dont le comportement est très différent. Elle pourra donc être détectée d'une autre manière. Le second est *E. Coli* car il se développe très vite, en quelques heures, pour former des colonies dont l'apparence est proche de celle de *P. aeruginosa*. Le dernier est *P. acnes* car il se développe dans des conditions anaérobies qui sont incompatibles avec nos tests sur boîte de Petri.

Dans chaque cas, quelques CFUs du micro-organisme choisi sont ajoutés à une solution de fluide de rinçage (*Fluid A* de Merck). Cette solution est filtrée à travers une membrane (HA ou HV) grâce à une pompe *EZ-stream* (Merck) connectée à une rampe de filtration. La membrane est finalement déposée sur une gélose dans une boîte de Petri. Le milieu de culture est choisi en fonction du micro-organisme suivant le Tab.3. À chaque fois, deux membranes sont préparées de manière à conserver un témoin. Les deux boîtes sont placées dans la plateforme d'acquisition, l'une dans le dispositif de maintien pour être numérisée, et l'autre à proximité. Cela nous a permis de démontrer que l'acquisition n'a pas d'impact sur le développement des micro-organismes, puisque les deux membranes ont toujours présenté des croissances similaires, en nombre comme en taille des colonies.

Le prototype qui sert aux acquisitions est celui décrit Fig.3.2c, dont l'enceinte est régulée

en température. La membrane est balayée toutes les deux heures et reste dans le dispositif de maintien pendant toute la durée de l'incubation, soit 5 jours. Ceci permet de minimiser les erreurs de positionnement entre les acquisitions. Les mesures sur des micro-organismes ont en effet débuté avant que le prototype ne soit finalisé, donc avant la mise en place de la vérification de position décrite dans la Sect.3.2. Cependant, nous avons constaté que de nombreuses acquisitions présentent un décalage le long de l'axe du déplacement. Celui-ci provient de la stabilité de la table ($\pm 1 \text{ mm/s}$), de sa répétabilité bidirectionnelle ($1 \mu\text{m}$), de sa précision de *homing* ($\pm 0.6 \mu\text{m}$) ainsi que du décalage entre le début du mouvement de balayage et le lancement de l'acquisition, qui n'est pas toujours le même.

En tout, 8 séquences d'acquisitions utilisables ont été retenues. Les raisons pour le rejet des autres séquences sont variées : l'absence de colonies à la fin de la séquence, des variations importantes des conditions d'incubation favorisant l'apparition de buée et empêchant de mesurer la surface, des défauts logiciels,... Pour chaque séquence, nous disposons d'acquisitions sur les 8 bandes de la membrane.

La première base de données constituée à partir de ces acquisitions ne tient pas compte de toute la séquence. Seules les acquisitions T_0 correspondant à la première et T correspondant à la dernière sont utilisées. Ces données serviront à vérifier que l'algorithme est capable de détecter les micro-organismes à 5 jours en se basant sur deux acquisitions. Chaque combinaison d'images correspond à une zone des différentes membranes et mesure 256×256 pixels. Il y a 130 cas qui sont étudiés, dont 17 sans colonies et 113 avec. Ces cas sont représentatifs puisqu'ils regroupent plusieurs micro-organismes sur deux types de membrane et que les zones choisies sont prises partout sur la membrane.

Une seconde base de données est construite afin cette fois de caractériser les performances de l'algorithme. Nous cherchons à connaître les limites de sa capacité de détection. Nous considérons pour cela les séquences temporelles complètes. Des 8 séquences, 10 cas sont extraits, deux cas négatifs étant choisis sur des bandes où aucune colonie ne s'est développée. Les 10 séquences conservées sont décrites dans le Tab.5.1. Dans certains cas, il manque des acquisitions mais cela n'influe pas notre évaluation, sauf, nous le verrons, si la donnée manquante correspond à l'apparition de la colonie ou à la limite de détection de l'algorithme. Les données sont également réduites à des zones de 256×256 pixels choisies judicieusement, là où des colonies se sont développées pour les cas positifs, et en dehors de ces zones pour les cas négatifs.

Maintenant que nous avons décrit les données, nous pouvons tester les méthodes décrites au chapitre précédent, décrire les résultats obtenus et les améliorations apportées.

5.2 Résultats

Dans le cas de la méthode MaLOT, nous verrons que les premiers résultats obtenus ne sont pas satisfaisants, puisqu'ils présentent un taux de faux positifs élevé. Quelques méthodes sont donc présentées pour améliorer la dernière étape, celle du tri des données. Les résultats obtenus avec la méthode CAG sont ensuite exposés.

Séq	Membrane	Micro-organisme	Bande
1	HA	<i>D. anomala</i>	2
2	HA	négatif	0
3	HA	<i>M. extorquens</i>	2
4	HA	<i>P. aeruginosa</i>	2
6	HV	négatif	0
7	HV	<i>M. extorquens</i>	2
8	HV	<i>P. aeruginosa</i>	1
9	HV	<i>M. extorquens</i>	5
10	HA	<i>M. extorquens</i>	6
11	HV	<i>M. extorquens</i>	4

Table 5.1 – Description des données utilisées pour les tests. La séquence 5 n'est pas mentionnée car elle ne présente que quelques acquisitions au début et une seule à la fin, réalisée après 7 jours d'incubation, suite à une erreur du système.

5.2.1 Méthode MaLOT

Nous avons défini la taille des blocs et le nombre de voisins à utiliser en testant plusieurs paramètres sur nos données. Il en est sorti qu'une taille de bloc de 9 pixels et un nombre de voisins à 9 est le meilleur paramétrage. Si les blocs sont plus petits, la robustesse par rapport au décalage des données n'est pas suffisante, mais s'ils sont plus grands, le nombre d'erreurs augmente.

De plus, un test préliminaire est réalisé avant de lancer le calcul du LOF. Son but est de détecter rapidement les cas évidents où les colonies sont de grande taille. Comme cela correspond à une grande variation entre les deux images, nous évaluons la grandeur $t1$ correspondant à la moyenne des 10 plus grandes valeurs de la différence entre les deux images $T0$ et T brutes. Si $t1 > 20$, l'acquisition est directement considérée comme positive, et le LOF n'est pas calculé.

Méthode 1 : moyenne et variance des objets

Nous avons commencé par tester la méthode MaLOT sur la première base de données ($T0/T$). Le tri final est un seuillage sur la moyenne et la variance des objets détectés. Les résultats sont donnés dans le Tab.5.2. De nombreuses erreurs subsistent, que ce soit pour détecter les colonies (presque 8%) ou détecter qu'il n'y en a pas (47%). Pour y remédier, nous proposons de chercher d'autres paramètres sur les données, qui permettent de mieux discriminer les cas réellement positifs et les fausses détections.

N fx pos	8	N nég	17	%	47.06
N fx nég	9	N pos	113	%	7.96
N erreur	17	N cas	130	%	13.08

Table 5.2 – Résultats de la détection par la méthode MaLOT avec tri par seuillage sur la moyenne et la variance des données détectées. Données $T0/T$.

Méthode 2 : ratio et écart-type de la membrane

Pour cela, nous utilisons l'image binaire Z_b (obtenue suite au seuillage par la méthode d'Otsu) comme un masque. Cela nous permet d'étudier le comportement de différents paramètres sur (a) l'image entière, (b) les pixels détectés : $x \in S|Z_b(x) = 1$ ou (c) les pixels classés comme appartenant au fond : $x \in S|Z_b(x) = 0$. Sur ces trois groupes de données, nous avons calculé : le nombre de pixel, la moyenne, l'écart-type, le maximum et le minimum. En observant les résultats de détection avec et sans colonies, nous nous sommes aperçu que le nombre d'objets détectés en l'absence de colonies est souvent élevé et que les objets sont de petite taille. Nous avons donc ajouté comme paramètre le rapport entre le nombre de pixels détectés et le nombre d'objets (ou composantes connexes) C .

Nous avons visualisé toutes ces données deux à deux sous forme de nuages de points pour estimer celles qui présentent la meilleure séparation entre les cas positifs et les cas négatifs. Nous avons retenu au final deux critères, et leur représentation sous forme de nuage de point est donnée Fig.5.1 :

- le ratio entre le nombre de pixel détectés et le nombre d'objets : $t2a = \frac{\text{card}(x \in S|Z_b(x)=1)}{C}$,
- l'écart-type des pixels de l'image originale T classés comme appartenant au fond de l'image $t2b = \sigma(Z(x))$ avec $x \in S|Z_b(x) = 0$.

La détection est considérée comme négative si $t2a < 72$ ou $t2b > 0.94$. Les résultats de cette nouvelle version sont présentés dans le Tab.5.3, et en effet, le taux de faux positifs est réduit (0%) mais c'est largement au détriment des faux négatifs (30%). En faisant varier les seuils, le taux de faux négatifs est amélioré, mais en augmentant les faux positifs. Si les données paraissent en effet séparables avec ces paramètres, il est difficile de définir cette frontière en se limitant à deux seuils. Une troisième méthode est donc mise en place, utilisant l'apprentissage.

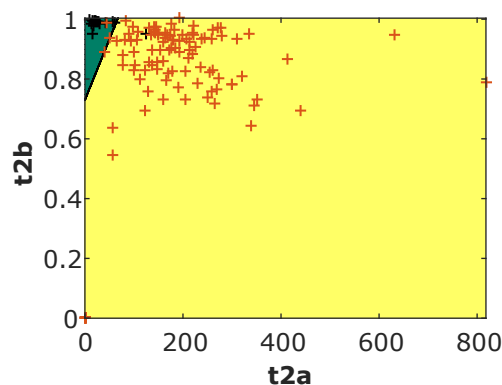


Figure 5.1 – Nuage de points correspondant aux valeurs de $t2a$ et de $t2b$. Les croix rouges correspondent aux données positives, et les noires aux données négatives. Les zones en jaune et en vert sont le résultat de la classification par le SVM linéaire. Les points en $(0,0)$ correspondent aux cas pour lesquels $t2a$ et $t2b$ n'ont pas été calculés car le test préliminaire $t1$ était positif.

Méthode 3 : apprentissage

Nous avons déjà étudié la classification dans le cas particulier de la détection de données aberrantes. Ici, nous sommes dans un cas plus classique où les données sont à séparer en deux groupes et où des données sont disponibles pour ces deux groupes. Nous nous intéressons donc

N fx pos	0	N nég	17	%	0
N fx nég	35	N pos	113	%	30.97
N erreur	35	N cas	130	%	26.92

Table 5.3 – Résultats de la détection par la méthode MaLOT avec tri par seuillage sur le rapport entre le nombre de pixels détectés et le nombre d’objets et la variance des pixels classés comme fond. Données $T0/T$.

à la classification supervisée. Différents classifieurs sont évalués grâce à l’application Matlab ‘*Classification Learner*’. Nous avons testé trois grandes familles : les SVMs, les méthodes de classification basées sur les plus proches voisins et les arbres de décisions. Dans ce contexte, un SVM estime la frontière permettant de maximiser la distance entre cette frontière et les données des différentes classes. La frontière est définie par quelques points de chaque classe, ceux qui en sont les plus proches. La seconde famille constitue des groupes de manière à minimiser la distance intra-classe (données proches) et maximiser la distance inter-classe (groupes éloignés). Les distances en question sont évaluées en se basant sur les k plus proches voisins de chaque donnée. Finalement, les arbres de décision sont des systèmes de classification qui évaluent les différentes caractéristiques une à une au fur et à mesure que l’arbre est descendu. Des critères sont construits lors de l’apprentissage qui permettent de passer d’une feuille à une autre, et finalement de déterminer la classe des données. Dans les trois cas, le classifieur obtenu grâce aux données d’apprentissage donne une carte des régions correspondant à chaque classe.

La méthode d’évaluation des classifieurs est basée sur la validation croisée. Le jeu de données d’apprentissage est divisé en 5 sous-groupes. L’algorithme est entraîné tour à tour sur chacun des groupes et les données restantes sont utilisées pour évaluer à chaque fois le classifieur. Les différentes méthodes sont testées sur la même partition des données. La performance de chaque classifieur est donnée comme la moyenne des résultats de classification pour les 5 cas (voir Tab.5.4).

Classifieur	Score (%)
<i>Linear SVM</i>	97.7
<i>Quadratic SVM</i>	96.2
<i>Cubic SVM</i>	96.9
<i>Simple Tree</i>	94.6
<i>Medium KNN (k=10)</i>	98.5
<i>Weighted KNN (k=10)</i>	97.7
<i>Boosted Trees</i>	96.9
<i>Medium gaussian SVM</i>	96.9

Table 5.4 – Résultats des classifieurs testés

Trois classifieurs donnent des résultats intéressants :

- Celui basé sur les plus proches voisins pondérés (*Weighted KNN*).
- Celui basé sur les plus proches voisins (*Medium KNN*).
- Celui basé sur le SVM linéaire.

Les deux premiers sont moins robustes à un changement des sous-groupes pour la validation

croisée. De plus, en observant les erreurs de classification dans ces 2 cas, nous nous sommes aperçu que la séparation correspond mieux aux clusters avec le SVM linéaire. Les deux autres classifieurs sont plus spécifiques et des faux positifs ou faux négatifs apparaissent au milieu des groupes. Le classifieur retenu finalement est donc le SVM linéaire, et la séparation obtenue est présentée Fig.5.1. Les résultats obtenus avec cette méthode sont donnés dans le Tab.5.5 et un exemple de bonne détection est illustré Fig.5.2. Cette méthode est intéressante, puisqu'elle atteint presque 98% de bonne détection. En analysant les 3 erreurs obtenues, nous avons remarqué qu'elles ont trois causes différentes.

N fx pos	1	N nég	17	%	5.89
N fx nég	2	N pos	113	%	1.77
N erreur	3	N cas	130	%	2.31

Table 5.5 – Résultats de la détection par la méthode MaLOT, avec tri par classification par SVM linéaire. Données $T0/T$.

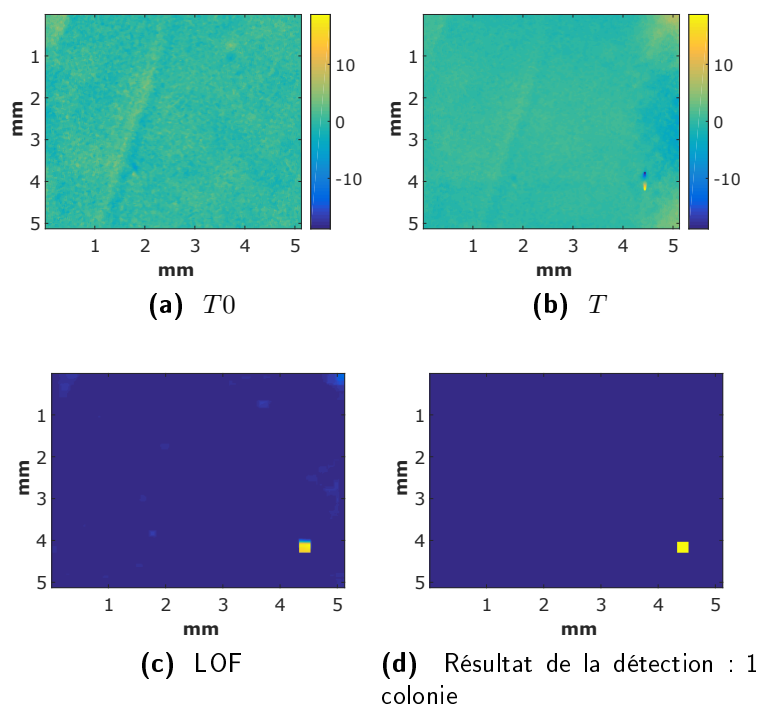


Figure 5.2 – Illustration de la détection d'une colonie à 5 jours. Malgré la présence d'un artefact, la colonie est détectée.

La première erreur est liée à un décalage très important entre les données de $T0$ et de T , qui provoque l'apparition d'un artefact à T qui était caché à $T0$ (Figs.5.3a à 5.3c). Cependant, même l'autre artefact présent sur les deux acquisitions est détecté, ce qui nous permet de conclure que l'algorithme n'est pas capable de traiter des déplacements importants entre les données. Ce qui était attendu puisque la taille des blocs n'est que de 9 pixels, ce qui limite la robustesse à des décalages de cet ordre de grandeur.

Les deux autres erreurs sont les cas où la colonie est manquée. Dans le premier cas, c'est parce qu'elle est au bord de l'image test, ce qui fait que la moitié de la colonie est en dehors

du champ (Figs.5.3d à 5.3f). Ce problème est résolu dans l'application grâce au chevauchement entre les bandes. Dans le second cas, l'erreur est liée au nombre d'objets détectés, qui est de 6. Dans les deux situations, cela fausse le calcul de $t2a$ (Figs.5.3g à 5.3i). Une façon d'y remédier serait de remplacer $t2a$ par la moyenne du nombre de pixels par objets.

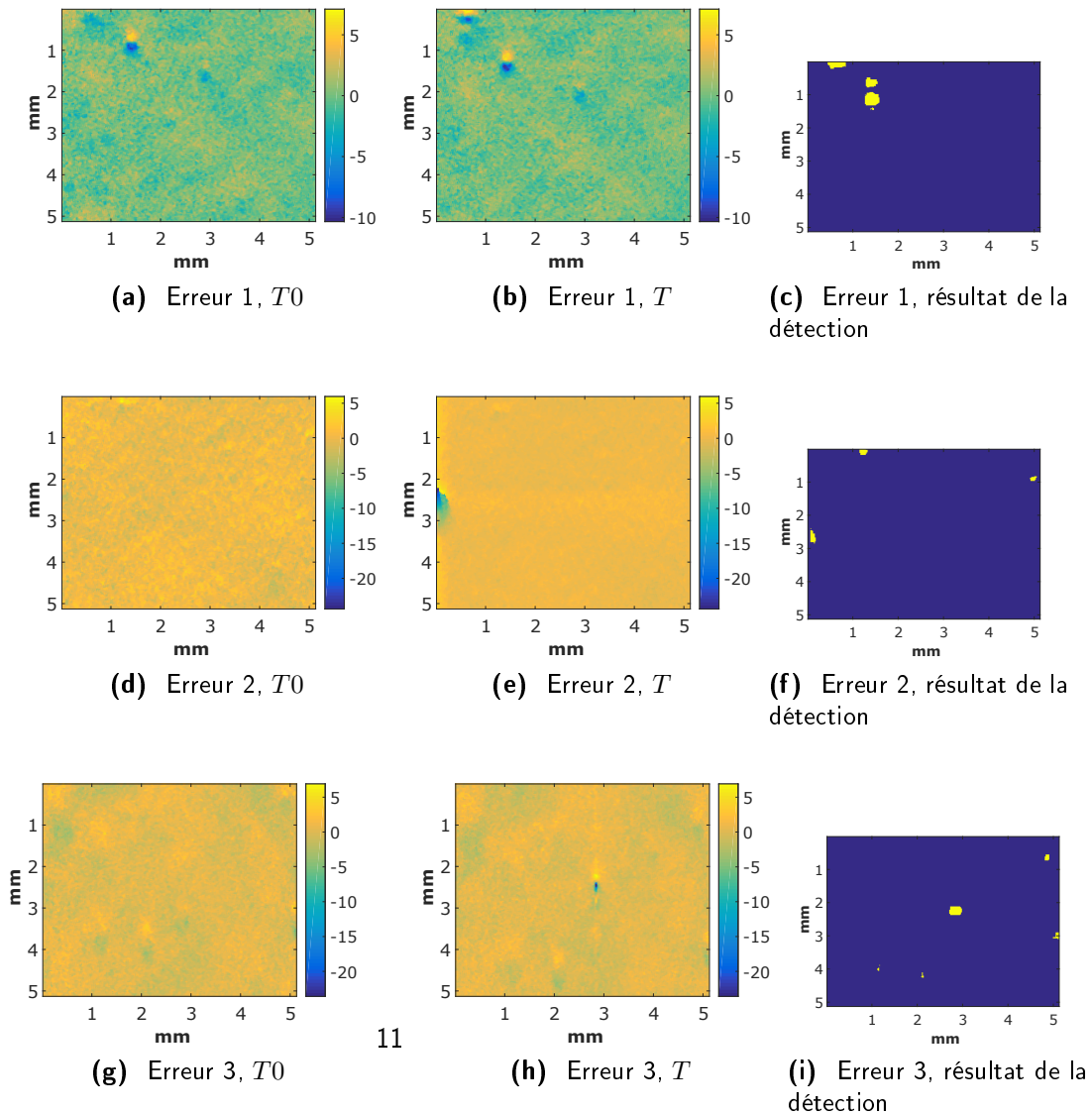


Figure 5.3 – Illustration des différentes erreurs rencontrées lors de la détection par la méthode MaLOT sur la base de donnée T_0/T .

5.2.2 Méthode CAG

Les résultats de l'algorithme basé sur les champs gaussiens obtenus sur les données acquises avec le capteur Keyence sont satisfaisants, puisqu'ils permettent de détecter les colonies de manière robuste à cinq jours et même avant. Le taux de faux positifs obtenu est de moins de 1% [Ahmad *et al.*, 2015]. Ces données sont acquises dans des conditions très favorables, puisqu'elles ne présentent pas de décalage ni de buée, très peu d'artefacts et que le signal obtenu par le capteur est un peu moins bruité que celui de la caméra Photonfocus.

Nous testons ici la méthode sur les données présentées Sect.5.1 et les résultats sont résumés dans le Tab.5.6. Il est clair que la méthode est très sensible au bruit, aux artefacts présents dans les données et au décalage entre les acquisitions, qui créent de nombreux faux positifs. Les faux négatifs sont dus à la taille des colonies dans l'image. En effet, les acquisitions sur *P.aeruginosa* présentent des colonies dont la taille est équivalente à celle de l'image. La présence de la colonie ne peut donc plus être considérée comme un événement rare car elle influence le champ gaussien modélisé sur l'image T . Elle n'est donc pas détectée. Sur les données présentées, nous avons volontairement considéré des sous-images rognées, il faudra donc évaluer la détection sur des images de taille réelle. Par ailleurs, une stratégie multi-échelle sur les champs gaussiens a été étudiée pour palier à cette situation [Ahmad et Collet, 2015].

N fx pos	14	N nég	17	%	82.35
N fx nég	48	N pos	113	%	42.48
N erreur	62	N cas	130	%	47.69

Table 5.6 – Résultats de la détection basée sur la méthode CAG. Données T_0/T .

Nous avons donc validé dans un premier temps une méthode basée sur le LOF (MaLOT) qui permet de détecter des colonies de micro-organismes avec un taux d'erreur de 2% environ après 5 jours d'incubation, même sur des micro-organismes à développement lent. La méthode basée sur les champs gaussiens (CAG) présente quelques limitations et doit être étudiée plus en avant pour conclure sur ses performances.

5.3 Performances et discussion

Nous proposons dans cette dernière section d'aller un peu plus loin et de discuter les performances des deux algorithmes exposés, comme par exemple leur limite de détection sur des séquences temporelles. Nous discuterons à nouveau des erreurs de détection et évoquerons la durée des calculs. Nous terminerons par une discussion sur les performances des deux méthodes.

5.3.1 Performances de la méthode MaLOT

Pour évaluer l'algorithme créé et ses limites en terme de détection, nous utilisons la seconde base de donnée, c'est-à-dire les séquences temporelles. Pour créer une base de comparaison des résultats, nous établissons pour chaque acquisition une vérité terrain. Pour cela, les données sont observées séquence par séquence en partant de la fin. Cela permet de mieux localiser les colonies lorsqu'elles sont petites, en tenant compte des acquisitions où elles sont grandes et faciles à détecter. Pour chaque acquisition, la vérité terrain consiste à déterminer la présence ou l'absence de colonies. Les résultats sont donnés dans le Tab.5.7. Le taux de mauvaise classification des cas négatifs est un peu plus bas, à 4.3%. Ceci est en partie lié au fait que la base de données des séquences est plus grande, puisque dans le premier cas (Tab.5.5) il n'y a qu'une erreur pour 17 cas négatifs, contre 10 erreurs pour 232 cas négatifs dans le second cas (Tab.5.7). Au contraire, les cas positifs offrent de moins bons résultats, ce qui était attendu puisque les colonies sont

plus petites. Nous avons donc évalué le retard entre la première détection par l'algorithme et la première acquisition où des colonies sont visibles (vérité terrain). Cette étude est reportée dans le Tab.5.8. Si les cas 1 (manque d'acquisition) et 3 (buée) sont écartés, le retard est en moyenne de 4.3h. Par ailleurs, nous avons fait le constat que pour les séquences étudiées, la dernière acquisition est toujours classée correctement.

N fx pos	10	N nég	232	%	4.31
N fx nég	35	N pos	203	%	17.24
N erreur	45	N cas	435	%	10.34

Table 5.7 – Résultats de la détection par la méthode MaLOT avec tri par classification par SVM linéaire. Données en séquences complètes.

Acq	N vérité terrain	N algo	Diff en heures
1	30 ?	48 ?	36 ?
2	nég	nég	nég
3	20	32	24
4	15	17	4
6	nég	nég	nég
7	27	29	4
8	11	14	6
9	29	29	0
10	29	33	8
11	29	31	4

Table 5.8 – Retard du temps de première détection par l'algorithme MaLOT par rapport à la vérité terrain. Le cas 1 peut être écarté pour cette estimation car nous ne disposons pas des données 20 à 29 ni 44 à 47, ce qui induit une incertitude sur le moment exact de la détection pour la vérité terrain comme pour l'algorithme. Dans le cas 3, l'apparition de buée sur les acquisitions 24, 25, 27 et 31 joue probablement un rôle dans le retard de détection.

Nous avons analysé les cas correspondant à des erreurs de détection. Quatre situations sont responsables des faux positifs et quatre pour les faux négatifs. Nous avons déjà vu les problèmes liés :

- au décalage des données (2 cas créant des faux positifs, Figs.5.4a à 5.4c).
- au bruit présent dans l'image qui provoque de nombreuses détections, faussant la valeur de t_{2a} (20 cas créant des faux négatifs, Figs.5.5a à 5.5c). Ce cas est souvent la cause du retard de détection entre la vérité terrain et l'algorithme.

D'autres cas sont apparus avec ces nouvelles données, dont les quatre premiers provoquent également de nombreuses détections :

- lorsque la colonie est très petite (1 cas créant un faux négatif, Figs.5.5d à 5.5f),
- en présence de buée (4 cas créant des faux négatifs, Figs.5.5g à 5.5i),
- lorsque le couvercle crée de nombreux artefacts (4 cas créant des faux positifs, Figs.5.4d à 5.4f),
- si les acquisitions présentent une grande variation entre T_0 et T (2 cas créant des faux positifs, Figs.5.4g à 5.4i).

- Des objets (colonie ou artefact) placés au bord de l'image provoquent des erreurs (2 cas créant des faux positifs, Figs.5.4j à 5.4l).
- Finalement, une dernière configuration existe, si la colonie est très grande (10 cas créant des faux négatifs, Figs.5.5j à 5.5l), mais pas suffisamment pour être détectée lors du test $t1$. Cela impacte à la fois les pré-traitements et la détection, et conduit à des faux négatifs. Cette dernière erreur est probablement liée également à la taille choisie pour les sous-images (256x256 pixels), qui est du même ordre de grandeur que la taille atteinte par certains micro-organismes.

Certaines de ces erreurs de détection peuvent être évitées en prenant quelques précautions tout au long du processus lié à l'acquisition, en particulier lors de la manipulation et de la mise en place du dispositif de filtration. Une première précaution est d'ajouter différents calages pour diminuer les erreurs de positionnement de la membrane d'une acquisition à l'autre. Nous avons déjà vu la seconde précaution qui a été prise pour éviter la buée (chauffage et centrifugation), même si elle n'a pas été utilisée dans le cas de boîtes de Petri numérisées en continu. Nous avons déjà évoqué également l'utilisation d'une règle déclenchant l'acquisition non plus à une fréquence temporelle fixe, mais à une fréquence spatiale fixe. Toutes ces solutions permettent d'améliorer les images et donc d'augmenter les performances de détection de notre algorithme.

Nous abordons ici la problématique liée au temps de calcul. Les données présentées sont réduites à une taille de 256x256 pixels. Chaque calcul prend environ 50s. La partie la plus chronophage est le calcul des distances entre tous les pixels, dont la complexité dépend du produit de la dimension des données au carré (3^2 pour nous) et du nombre de voisins considérés ($k = 9$). Or seule une partie de ces distances sont utilisées. Différentes méthodes d'optimisation existent qui permettent de ne pas les calculer toutes. Le temps de calcul peut être réduit en utilisant le cadre des *kD-tree*, qui permet de ne calculer que certaines distances pertinentes [Gray et Moore, 2000; Chaudhary *et al.*, 2002]. D'autres auteurs se sont intéressés à la réduction du temps de calcul en jouant à la fois sur la façon de faire le calcul, mais aussi sur la manière dont les données sont chargées en mémoire [Knorr et Ng, 1998; Wan et Bian, 2008]. Ils proposent une méthode basée sur la partition des données en cellules.

Enfin, l'algorithme est performant pour les micro-organismes testés, mais des tests doivent être faits en élargissant leur nombre et leur variété (cas des moisissures) ainsi qu'en présence de nombreuses particules. Il faut aussi regarder des configurations mélangées, c'est-à-dire avec plusieurs micro-organismes. Du point de vue de l'algorithme, dans le cadre d'acquisitions avec le dispositif de filtration du test de stérilité, il manque enfin l'étape de sélection de la zone d'intérêt pour chaque bande. Cela permettrait de ne pas évaluer inutilement plusieurs fois le même point dans différentes bandes et de bien cadrer la zone de l'acquisition qui n'est pas hors membrane.

5.3.2 Performances de la méthode CAG

Sur les 10 séquences temporelles, les résultats (Tab.5.9) sont meilleurs que sur les données ne prenant en compte que deux acquisitions, à $T0$ et à T , lorsque les colonies sont grandes. Cette amélioration vient du fait que les colonies plus petites sont bien détectées par l'algorithme CAG. Cette performance est confirmée par le fait que dans la majorité des cas, aucun retard n'est

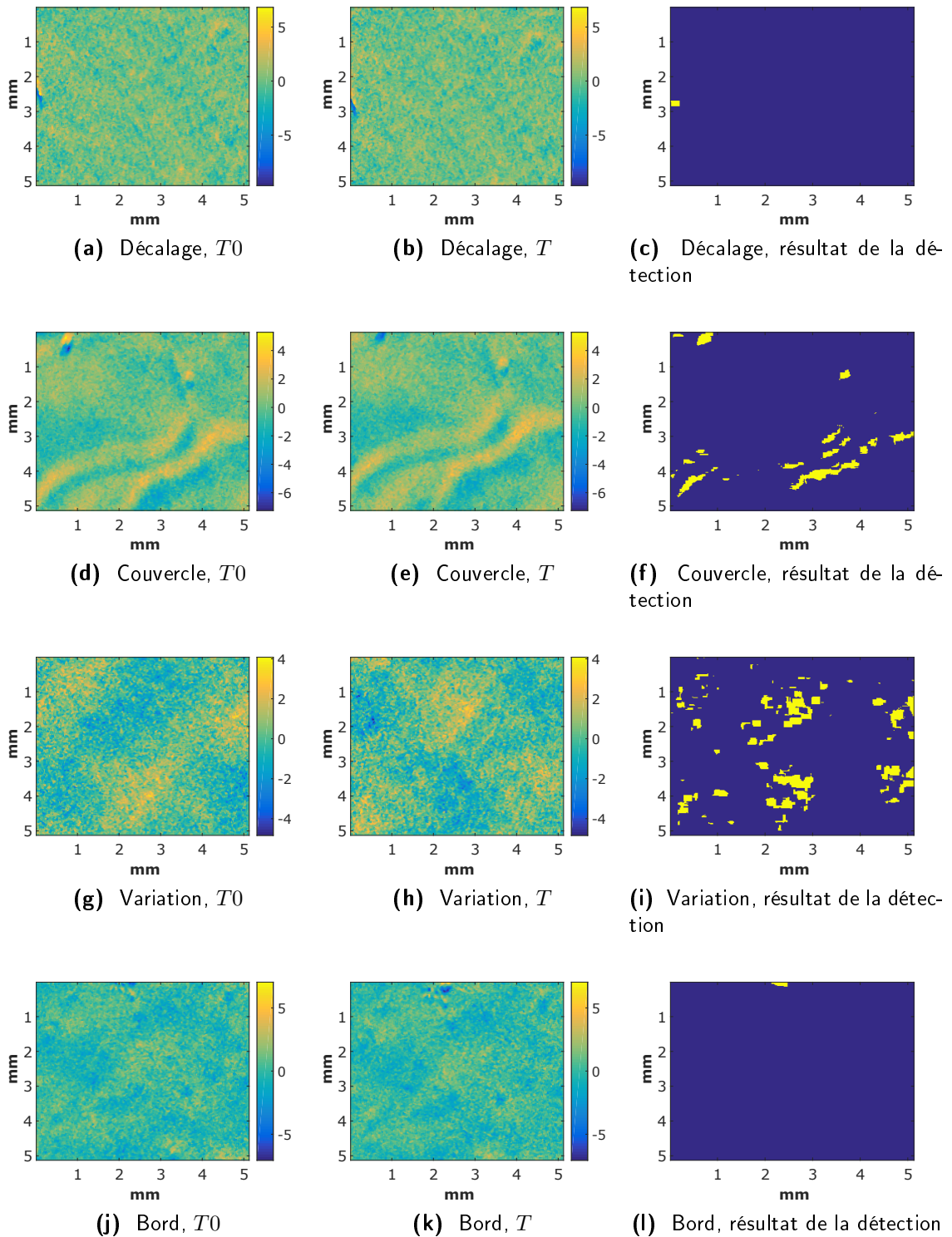


Figure 5.4 – Illustration des différentes erreurs rencontrées lors de la détection par la méthode MaLOT sur les séquences. Cas des faux positifs.

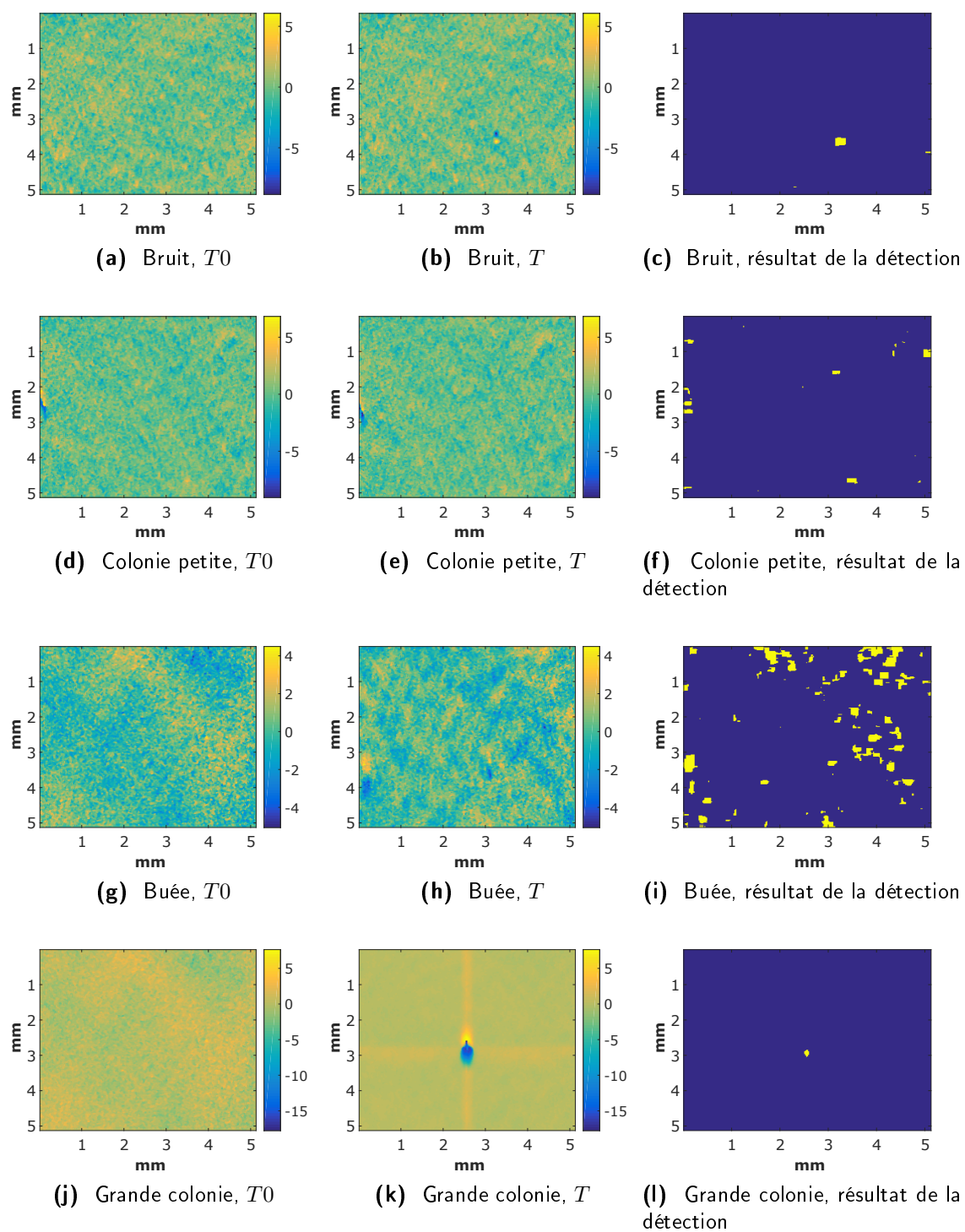


Figure 5.5 – Illustration des différentes erreurs rencontrées lors de la détection par la méthode MaLOT sur les séquences. Cas des faux négatifs.

constaté entre la détection par l'algorithme et la vérité terrain (c'est-à-dire lorsque les colonies sont visibles dans les acquisitions 3D). Seules deux séquences présentent une différence. Dans la séquence 7, la première détection d'une colonie est faite 8h après la vérité terrain (4 acquisitions), et pour la séquence 10, le décalage est de 6h (3 acquisitions). Cela donne un retard moyen de 1.75 heures.

N fx pos	81	N nég	232	%	34.91
N fx nég	47	N pos	203	%	23.15
N erreur	128	N cas	435	%	29.43

Table 5.9 – Résultats de la détection basée sur la méthode CAG. Données en séquences complètes.

Les différentes erreurs observées sont principalement liées au décalage entre les acquisitions, qui crée des faux positifs, ainsi qu'à la taille des colonies, responsable de faux négatifs lorsqu'elle est trop grande. La méthode CAG est plus sensible au décalage, puisque la comparaison des objets détectés n'en tient pas compte. De même, l'apparition de buée influence les paramètres du modèle estimé ce qui rend cet algorithme très sensible à ces phénomènes. Quelques exemples sont donnés Fig.5.6 pour les bonnes détections et Fig.5.7 pour les erreurs. Concernant les erreurs de détection présentées, la première est un faux négatif (Figs.5.7a à 5.7c) qui est lié à l'apparition de buée lors de l'acquisition à T . Le second cas (Figs.5.7d à 5.7f) est un faux positif causé par le décalage entre les acquisitions T_0 et T .

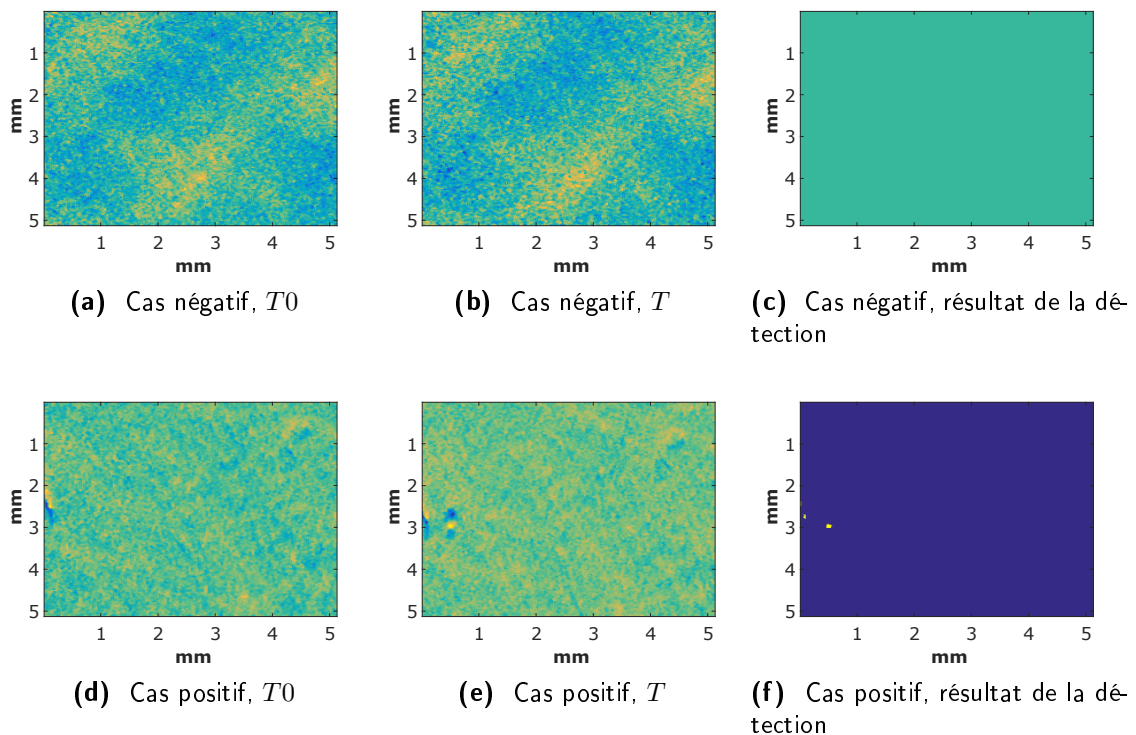


Figure 5.6 – Illustration de deux détections correctes rencontrées lors de la détection sur les séquences par la méthode CAG.

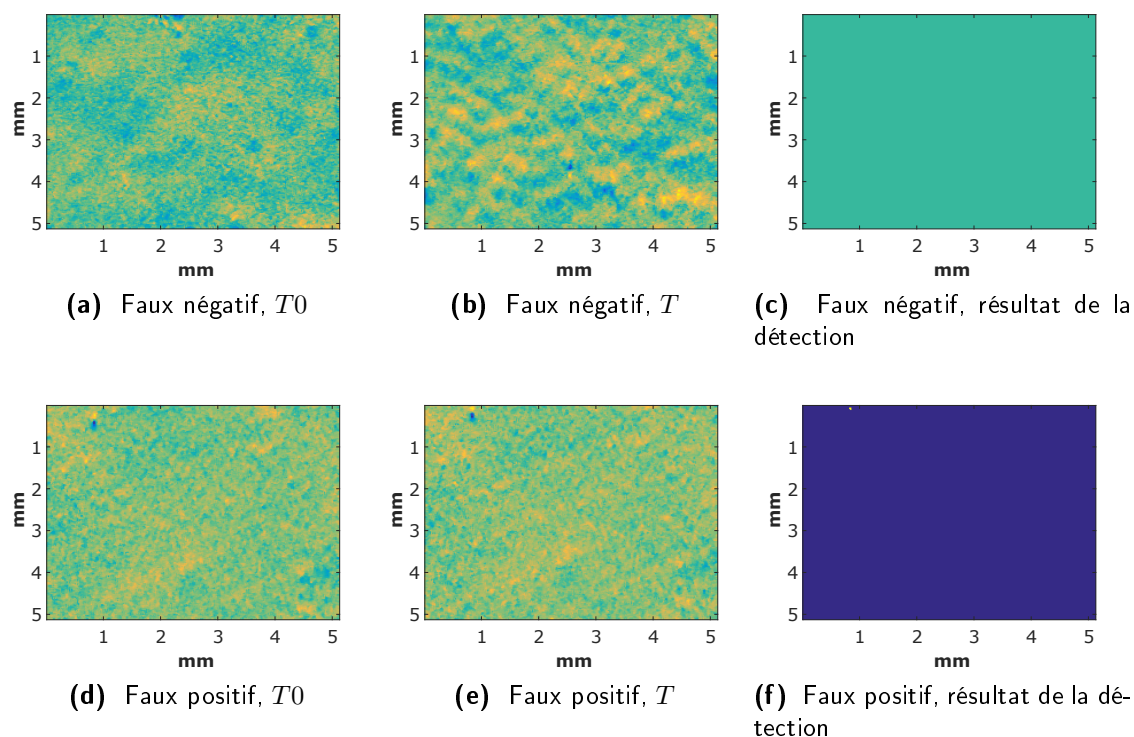


Figure 5.7 – Illustration de deux détections erronées rencontrées lors de la détection sur les séquences par la méthode CAG.

Cet algorithme est très performant, surtout pour des acquisitions très précoces où les colonies sont très petites. Il n'est cependant pas aussi robuste que la méthode précédente, et le moindre artefact compromet la détection. Pour améliorer ce point, différents pré-traitements pourraient être ajoutés, comme par exemple un recalage pour aligner les données. D'autre part, si le temps de calcul dépend du nombre de composantes connexes seuillées, il reste faible. La détection prend en effet moins d'une seconde sur les données de taille 256×256 . La phase de comparaison des objets détectés entre T_0 et T peut prendre de zéro à quelques secondes. Ce faible temps de calcul est un des avantages de l'utilisation de champs gaussiens.

Des améliorations de la méthode ont été proposées. Nous avons déjà évoqué l'étude multi-échelle des données pour être capable de mieux détecter les colonies quelle que soit leur taille. Cela permettrait également de mieux les localiser et donc de déduire des informations géométriques sur celles-ci. Il a par ailleurs été ajouté une étude temporelle basée sur les séquences, qui permet d'augmenter encore la connaissance sur les objets détectés en suivant leur évolution au cours du temps. Ces méthodes sont décrites dans un article soumis [Ahmad et Collet, 2015], et leur but est d'aller plus loin que la détection en identifiant les micro-organismes présents.

5.3.3 Discussion

Le Tab.5.10 résume les résultats obtenus avec les deux algorithmes. Nous nous intéressons tout d'abord aux taux d'erreur des deux méthodes. D'après les résultats, la méthode CAG manque de robustesse sur les données du système final, au contraire de la méthode MaLOT. Cet avantage

est lié au fait qu'elle détecte un changement entre les acquisitions, ce dont l'estimation par les champs gaussiens ne tient pas compte. De plus, l'utilisation du calcul par bloc rend la détection plus robuste. L'utilisation de bloc pourrait être appliquée pour l'algorithme CAG lors de l'étape de comparaison. La recherche serait alors élargie à quelques pixels autour de chaque objet détecté, permettant ainsi de mieux compenser un éventuel décalage entre les acquisitions. Aucune des deux méthodes n'est par ailleurs robuste à l'apparition de buée puisque celle-ci empêche la mesure de la surface.

L'observation du retard moyen entre la détection par les algorithmes et la vérité terrain montre que la méthode CAG est bien plus performante, puisqu'elle ne présente le plus souvent pas de retard de détection. C'est un avantage qui pourrait permettre de réduire le temps d'incubation en dessous de cinq jours, ou tout au moins qui permettrait de détecter les résultats positifs de manière précoce, dès leur apparition dans le cas d'acquisitions multiples. Quoiqu'il en soit, pour l'application, seules deux numérisations de la surface sont disponibles et la seconde est réalisée après 5 jours d'incubation, ce qui permet d'utiliser la méthode MaLOT malgré ses moins bonnes performances concernant la limite de détection.

Finalement, nous l'avons déjà remarqué, le temps de calcul est le principal point à améliorer au niveau du calcul des distances de la méthode MaLOT afin de remplir le cahier des charges d'une détection rapide. Pour ce point, la méthode CAG ne pose de problèmes que si le nombre d'objets détectés est très important, ce qui est rare puisque le seuil est estimé automatiquement en fonction des données et qu'un premier tri est réalisé avant l'étape de comparaison des données.

	MaLOT	CAG
Taux d'erreur sur $T0/T5$	2.31%	47.69%
Taux d'erreur sur séquences	10.34%	29.43%
Retard moyen sur séquences	4.3h	1.75h
Temps de calcul (256x256)	50s	<5s

Table 5.10 – Tableau de comparaison des deux algorithmes.

Pour poursuivre cette discussion, la séquence 7 a été utilisée pour tester les deux algorithmes sur des images complètes, de taille 1000x1000 pixels. C'est la seconde bande sur les huit qui a été utilisée, et les résultats sont récapitulés dans le Tab.5.11. Le micro-organisme correspondant est *D. anomala* et il est filtré sur membrane HV. Le résultat présente 3 colonies. Aucune modification n'a été apportée aux codes pour les adapter à cette taille d'image. Cela provoque certainement le retard de détection lié au nombre important de colonies manquées par l'algorithme MaLOT. La détection en elle-même ne tient pas compte de la taille de l'image, mais celle-ci a un effet sur les statistiques de l'image utilisées pour le tri final. Une solution serait de faire un nouvel apprentissage du SVM sur un nombre suffisant de données. Cependant, à l'heure actuelle, l'algorithme MaLOT est trop chronophage. Concernant la méthode CAG, les conclusions sont toujours les mêmes, celle-ci étant auto-adaptable et toujours limitée par les décalages des données ou les artefacts. Quoiqu'il en soit, dans les deux cas, le résultat de la détection à 5 jours est conforme à la vérité terrain.

Sur ces données, les temps de calcul sont de 6h par acquisition pour la méthode MaLOT

et de moins d'une seconde pour la partie détection de la méthode CAG. La durée de la partie comparaison dépend à nouveau du nombre de composantes seuillées et possédant une hauteur ou une surface suffisamment significatives.

Acq	VT	LOF	CAG	Acq	VT	LOF	CAG
0	-	na	na	28	+	0	5
1	-	0	4	29	+	0	5
2	-	0	2	30	+	0	2
3	-	0	1	31	+	0	4
4	-	0	2	32	+	0	4
5	-	0	1	33	+	0	7
6	-	0	2	34	+	0	2
7	-	0	4	35	+	0	4
8	-	0	5	36	+	0	5
9	-	0	3	37	+	0	2
10	-	0	0	38	+	0	3
11	-	0	5	39	+	0	3
12	-	0	4	40	+	0	2
13	-	0	3	42	+	0	1
14	-	0	0	43	+	0	0
16	-	0	2	47	+	0	7
17	-	0	5	48	+	0	3
19	-	0	7	49	+	0	5
22	-	0	0	50	+	1	4
23	-	0	3	52	+	1	4
24	-	0	6	56	+	1	3
25	-	na	3	57	+	1	3
26	-	0	3	58	+	na	na
27	+	0	0				

Table 5.11 – Tableau de comparaison des résultats obtenus par les algorithmes basés sur le Local Outlier Factor (LOF) et sur les Champs Aléatoires Gaussiens (CAG) sur une séquence d'acquisition. Dans la colonne VT (Vérité Terrain), les - désignent les acquisitions qui ne présentent pas de colonies et les + les cas où il y en a. Pour chacun des deux algorithmes, la valeur reportée donne le nombre d'objets détectés.

Conclusion Dans ce chapitre, nous avons constaté que la méthode MaLOT est efficace sur nos données à 5 jours à quasiment 98%. Elle n'implique que 4h de retard par rapport à la vérité terrain sur les acquisitions et permet de raccourcir l'incubation de 14 jours à 5 jours. Nous avons également vu qu'il reste à optimiser la méthode pour diminuer le temps nécessaire au calcul des plus proches voisins.

Concernant la méthode CAG, elle présente l'avantage d'être capable de détecter des objets de petite taille et est très rapide. Elle manque cependant de robustesse, ce qui peut être compensé par l'ajout de pré-traitements adaptés, en plus des améliorations du système déjà évoquées pour la méthode précédente. Comme ces améliorations prendraient plus de temps, l'implémentation finale reposera sur la méthode MaLOT, dont les performances sont déjà proches du but fixé (99% de bonne détection à 5 jours).

Enfin, dans les deux cas, l'adaptation de l'algorithme dans le cadre spécifique de l'application de test de stérilité reste à finaliser. Cela consiste par exemple à ajouter la détection de la région d'intérêt dans les acquisitions.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Cette thèse a été réalisée en collaboration avec différents acteurs académiques et industriels dans le but de concevoir une nouvelle plateforme pour le test de stérilité pour l'industrie pharmaceutique. Ce test fait partie des différents contrôles permettant de s'assurer de la qualité d'un produit. Il est obligatoire avant toute mise sur le marché d'un médicament. Chaque lot est donc testé systématiquement. Pour rendre le test plus robuste et reproductible, la nouvelle plateforme doit être capable d'évaluer automatiquement si l'échantillon est contaminé ou non. Les contaminants recherchés sont des micro-organismes vivants comme des bactéries, des levures ou des moisissures.

L'autre intérêt visé par l'automatisation de la plateforme est de pouvoir détecter les contaminants plus tôt qu'avec le test actuel. Réduire le temps de détection, c'est-à-dire proposer une méthode précoce serait un élément différenciant sur ce marché. Ce gain de temps aurait en effet un impact économique positif pour les laboratoires pharmaceutiques, puisqu'ils doivent stocker les produits jusqu'à l'obtention de la réponse du test, ce qui représente des frais d'immobilisation de capital.

Tout au long de ce manuscrit, nous avons décrit le système qui a été conçu dans le but d'acquérir un signal de manière automatique et de le traiter pour détecter d'éventuelles colonies de micro-organismes après une incubation courte et dans un dispositif clos. Nous avons choisi pour cela d'utiliser la mesure 3D par triangulation, afin d'obtenir une image de hauteur correspondant à la surface d'une membrane où les éventuels micro-organismes se développent. L'intérêt de cette méthode est qu'elle ne dépend pas du contraste entre les micro-organismes et leur environnement. Elle permet également, grâce à la longueur d'onde choisie ($\lambda = 465 \text{ nm}$) de lire à travers le couvercle. Nous avons de plus amélioré les performances de la méthode en remplaçant la ligne laser habituellement utilisée par une ligne innovante générée par des LEDs. Cela a permis de réduire le bruit dans les données et représente un gain au niveau du temps d'incubation minimal nécessaire pour détecter les colonies. Finalement, la mise en œuvre choisie permet l'acquisition de l'intégralité de la membrane sans zones d'ombre liées au dispositif grâce à une lecture par bandes. Le système d'acquisition que nous avons élaboré consiste en la ligne LED, une caméra 2D-3D, différentes optiques et deux tables de déplacement, l'une linéaire et l'autre en rotation.

L'algorithme élaboré pour traiter les données repose sur une méthode de détection de données aberrantes, le calcul du LOF. Les objets détectés sont triés par un SVM linéaire. Cette méthode a été comparée à un algorithme élaboré dans le même but et basé sur la modélisation par des

champs aléatoires gaussiens, qui se révèle moins robuste mais plus rapide. Grâce au système d'acquisition construit ainsi qu'à l'algorithme MaLOT, nous sommes capables de détecter la présence de micro-organismes après 5 jours d'incubation, au lieu des 14 jours requis aujourd'hui avec la méthode traditionnelle. Nous obtenons 2% d'erreur de détection, pour un objectif de 1% d'erreur. De même, le temps de calcul pour l'algorithme de détection (quelques heures) dépasse la valeur mentionnée dans le cahier de charges (quelques minutes).

Un premier axe d'amélioration est de diminuer la présence d'artefacts dans l'acquisition. Par exemple en mettant en œuvre une règle magnétique qui permettrait de rendre les acquisitions plus régulières spatialement et mieux recalées. Une autre approche pourrait être de diminuer les vibrations dans les acquisitions en utilisant une table de déplacement générant moins de bruit lors de ses mouvements.

Dans le cadre restreint de l'application de test de stérilité, il faut également ajouter une étape liée au concept final du dispositif de filtration et permettant de sélectionner les zones correspondant à la membrane dans les données acquises. Le cas de la détection des moisissures doit aussi être traité, par exemple grâce à un test au début de l'algorithme puisque ces micro-organismes créent un signal très bruité caractéristique et facile à repérer. Enfin, il convient d'optimiser l'algorithme pour diminuer le temps de calcul. Les méthodes envisageables pour cela sont par exemple axées sur la partition des données en cellules ou sur l'utilisation d'arbres.

Perspectives

Le système élaboré est un concept innovant du point de vue de l'acquisition, soutenu par deux brevets déposés. La méthode peut être appliquée à d'autres thématiques. Nous pensons en particulier au comptage automatisé de colonies, pour des applications comme le contrôle d'environnement ou de charge biologique. Dans un cadre plus large, la triangulation utilisant une ligne LED peut être une alternative intéressante pour des mesures de surface demandant une résolution suffisante tout en ne nécessitant pas de forte puissance d'éclairage. L'instrument développé est en effet adapté aux mesures mésoscopiques, ce qui correspond par exemple à de nombreuses applications dans l'industrie agro-alimentaire. Nous pouvons par ailleurs envisager pour le futur qu'il n'y ait plus la limitation de puissance de la ligne LED, puisqu'un nouveau modèle de ligne LED a été conçu, qui se rapproche de la puissance du laser pour un coût équivalent. Le test de celui-ci pourrait d'ailleurs être une prochaine étape dans le cadre de l'implémentation de la méthode.

Pour poursuivre le travail à la suite de la détection, il pourrait être intéressant de travailler sur l'identification des colonies. Une première approche pourrait se baser sur les objets détectés avec la méthode MaLOT afin de les classer pour identifier, par exemple, la présence de plusieurs souches de micro-organismes et les différencier.

Par ailleurs, dans un contexte indépendant du test de stérilité, il est envisageable d'utiliser une méthode d'apprentissage nécessitant une base de données. Il est en effet possible de compenser le problème de la constitution de celle-ci ainsi que celui de la variabilité du vivant en testant des méthodes évolutives, non-supervisées ou semi-supervisées. De plus, le système d'acquisition

autorise la prise d'images en niveaux de gris en parallèle de la mesure tri-dimensionnelle. Ces données une fois recalées entre elles pourraient fournir des informations supplémentaires pour l'identification. Il serait même envisageable d'utiliser une autre caméra équipée d'un capteur RGB, proche infrarouge (NIR) ou hyperspectral. La combinaison de ces modalités pourrait donner une base de connaissance suffisamment discriminante pour compenser en partie la variabilité du monde du vivant en microbiologie et parvenir à identifier automatiquement les micro-organismes.

Annexe A

Triangulation, équations

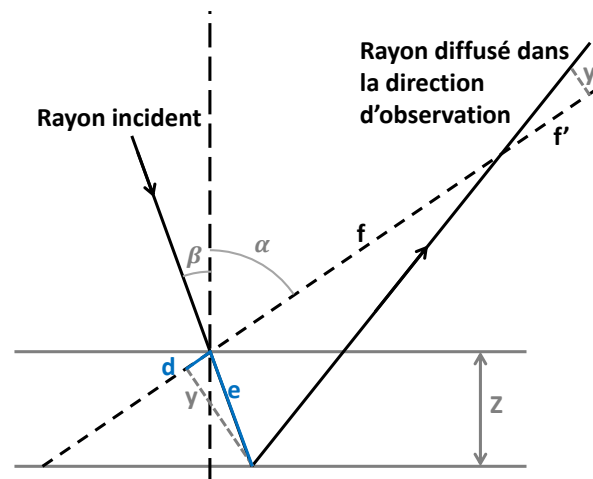


Figure A.1 – Description d'un système de triangulation, parcours du rayon incident.

On introduit les notations intermédiaires d et e qui permettent d'établir les quatre équations suivantes.

$$\tan(\alpha + \beta) = \frac{y}{d} \Rightarrow d = \frac{y}{\tan(\alpha + \beta)}$$

$$\frac{y}{y'} = \frac{f + d}{f'} \Rightarrow y' = \frac{yf'}{f + d} \quad (\text{A.1})$$

$$\cos(\beta) = \frac{Z}{e} \Rightarrow e = \frac{Z}{\cos(\beta)}$$

$$\sin(\alpha + \beta) = \frac{y}{e} \Rightarrow y = e \sin(\alpha + \beta)$$

En partant de l'Eq. A.1, on a :

$$\begin{aligned}y' &= \frac{e \sin(\alpha + \beta) f'}{f + \frac{y}{\tan(\alpha + \beta)}} \\&= \frac{Z f' \sin(\alpha + \beta)}{f \cos(\beta) + \frac{e \sin(\alpha + \beta) \cos(\beta)}{\tan(\alpha + \beta)}} \\&= Z f' \frac{\sin(\alpha + \beta)}{f \cos(\beta) + Z \cos(\alpha + \beta)} \\y' &= Z \frac{f'}{f} \frac{\sin(\alpha + \beta)}{\cos(\beta) + \frac{Z}{f} \cos(\alpha + \beta)}\end{aligned}\tag{A.2}$$

On peut en extraire :

$$Z = \frac{y' f \cos(\beta)}{f' \sin(\alpha + \beta) - y' \cos(\alpha + \beta)}\tag{A.3}$$

Comme $\frac{y' \cos(\alpha + \beta)}{f' \sin(\alpha + \beta)} \ll 1$,

$$Z = \frac{y' f \cos(\beta)}{f' \sin(\alpha + \beta)}$$

Et on en déduit que la résolution d'un système de triangulation suit :

$$\Delta Z = \Delta y' M \frac{\cos(\beta)}{\sin(\alpha + \beta)}$$

où $M = \frac{f}{f'}$.

Annexe B

Profondeur de champ

La profondeur de champ P est la distance entre le premier plan net (ppn) et le dernier plan net (dpn) du système optique.

$$P = d_{dpn} - d_{ppn}$$

Les distances d_{dpn} et d_{ppn} peuvent être exprimées en fonction de la distance de mise au point d et de la distance hyperfocale h , distance minimale à partir de laquelle tout est net. Puisque nous utilisons un objectif de distance focale $f = 50 \text{ mm}$, h sera plus grand que d qui vaut $\approx 30 \text{ mm}$. Dans cette configuration, nous pouvons écrire :

$$d_{dpn} = \frac{hd}{h-d} \text{ et } d_{ppn} = \frac{hd}{h+d}$$

Ce qui donne donc :

$$P = \frac{hd}{h-d} - \frac{hd}{h+d} = \frac{2hd^2}{h^2 - d^2}$$

Or $h = f^2/(Nc)$, où N désigne l'ouverture de l'objectif et c le diamètre du cercle de confusion. En remplaçant, on obtient :

$$P = \frac{2Ncf^2d^2}{f^4 - N^2c^2d^2}$$

Or $N^2c^2d^2 \ll f^4$, ce terme est donc négligé et finalement :

$$P \approx \frac{2Ncf^2d^2}{f^4}$$

Annexe C

Paramètres de la caméra

Les paramètres sont donnés pour la caméra en mode 3D avec la ligne LED. On ne donne que les valeurs d'intérêt. Les autres sont restées dans la configuration d'usine, sauf pour la communication Gigabit Ethernet utilisée avec les paramètres adaptés à notre machine.

Paramètre	Valeur
AcquisitionMode	3D
ExposureTime	700 μm
TriggerMode	ON
Trigger_EnBurstTrigger	True
Trigger_BurstTriggerPeriodTime	725 μm
Peak0_Threshold	210
Peak0_3DY	256
Peak0_3DH	256
Multislope_Mode	OFF
PeakDetector_Mode	3D

Annexe D

Article

Article soumis au Journal of Food Engineering.

LED based 3D imaging device to observe colonies of micro-organisms

Marine Bouthillon^{a,b,*}, Yoshitane Takakura^a, Ola Ahmad^a, Luc Felden^b, Christophe Collet^a

^a*ICube, Université de Strasbourg, CNRS (UMR 7357), 300 Bd Sébastien Brant, BP 10413, Illkirch-Cedex, France, 67412*

^b*Millipore SAS, 39 Route Industrielle de la Hardt, 67124 Molsheim, France, A subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany*

Abstract

Micro-organisms are responsible for food spoilage, contamination or on the contrary, are required for food processing. In both cases, they have to be detected and enumerated. In such a context, we have designed an innovative imaging device based on LED generated pattern to form 3D images of growing micro-colonies. Such a device has been characterized, compared to laser driven imagery and tested on both calibrated micro-objects and ground truth data such as *dekkera anomala*. Experimental results indicate that the signal-to-noise ratio can be significantly improved by using LED lighting, which permits to detect growing colonies at a very early stage. We believe that the device will be of great interest to microbiologists by reducing the incubation period required for micro-colonies observation, which also signifies costs saving.

Keywords: micro-organisms colony, three-dimensional image formation, height measurements, LED lighting, laser lighting

Highlights:

- Micro-organisms colonies monitoring using 3D imaging.
- Improved image quality with LED lighting.
- Incubation period shortened of around a third.

1. Introduction

In food and beverage industries, quality and safety controls are performed all along production and processing. Those controls often rely on microbiological methods to measure the bioburden of the samples. The aim

is to count the number of colonies (Brugger et al., 2012), or to detect their presence. Even though this task has been mainly performed by operators, numerous tools are now being developed to help or automate processes. Systems commonly used for colony monitoring are cameras with adequate lighting (dark field (Brugger et al., 2012), fluorescence (Chollet et al., 2008)), which are sensitive to the colour and to the contrast of the colonies. They often require time consuming preparation or reagent addition. When micro-organisms grow on solid medium (agar or membrane deposited on agar), they form domes that can be reconstructed with three dimensional imagery. Sansoni et al. (2009) describe methods available for 3D imaging and focus on the use of monocular images, on time delay measurement and on laser triangulation, which avoids the contrast issues and reagents. Such a system

*Corresponding author

Email address:

marine.bouthillon@etu.unistra.fr (Marine Bouthillon)

also displays a high acquisition rate, ease-of-use and low cost. Triangulation methods are now widely used for surface engineering related applications such as quality control (Berglund and Grönlund, 2013) and medical assistance (Quest et al., 2012). The limitations have been studied (Muralikrishnan et al., 2012) and compared to systems such as touch-probes (Businski et al., 1992).

Within the framework of triangulation, we have investigated LED based lighting. Most existing devices are based on laser for its high intensity but are limited by the coherence. Coherence is responsible for interferences between light waves into the beam. The waves can add together or subtract, creating a non-homogeneous light. This effect is called speckle noise. It has a direct impact on the performance, especially regarding signal to noise ratio. A new generation of light emitting diodes (LEDs) seems to offer a new alternative for optical triangulation. The development of power LEDs in the last few years permitted to replace laser and consequently to reduce measurement uncertainties. Rückwardt et al. (2011) have adopted this solution and focused on a LED line projector. In this paper, we have analyzed the performance of a LED based imaging system as growing micro-organisms monitor.

This paper is organized as follows: section 2 is devoted to triangulation, describes our setup and compares LED and laser lines. In section 3, we focus on the acquisitions to compare the performances on a raw surface, on calibrated objects and on colonies of micro-organisms. Some perspectives are drawn in the conclusion.

2. 3D acquisition of surface

2.1. Optical set-up

A triangulation system is made of two main parts assembled as shown in Fig. 1a, a light source and a sensor. The light source emits a pattern (in our case a line) towards the surface of interest. The sensor acquires the light

reflected by the pattern from the surface. The angle between the optical axis of the sensor and the light beam is called the triangulation angle. It must be different from zero so that the line shape changes according to the surface topography. The deformation of the line pattern is proportional to the shape of the surface. The resolution in height of this system follows Eq. 1,

$$\Delta z = \Delta x \frac{\cos(\beta)}{\sin(\alpha + \beta)}, \quad (1)$$

where Δz is the vertical resolution, Δx the lateral resolution, α the angle of the sensor and β the angle of the light source. As shown in Fig. 1b, increasing the triangulation angle increases the resolution. However it also reduces the robustness of the measurement by reducing the amount of light received by the sensor and increasing the risk of missing data (shadowed or out of range).

As for the lines, the broadly emitted non-parallel incoherent light of the LED requires the use of a slit with focusing optics, as described in Fig. 2b. This method introduces intensity losses. The tested slit has a thickness of $50 \mu m$. The emitted line is focused by a $50 mm$ focal length objective, according to the table provided by the manufacturer (Efilux, 2014). In this setup, it produces a $15 mm$ long line. In our application, the required line length should be adjusted to $20 mm$, therefore we added a $23 mm$ extension tube (the produced line is longer, but only 80% of the line is considered for measurements, so that non-uniformities at both ends are avoided).

The laser beam is coherent and can be collimated and focused, thus making the use of a Powell lens possible (Fig. 2a), and hence preventing energy loss by redirecting the whole ray into a line. The laser focuses from $100 mm$ to the far field, so we can use both projectors in the same conditions. It is equipped with a linear polarizer.

The image of the line on the object is acquired using a CMOS camera. The width

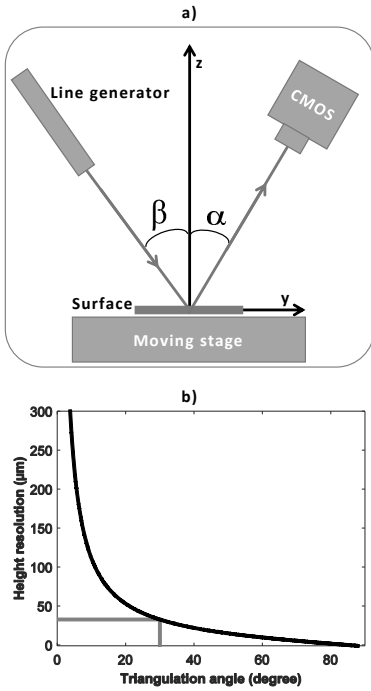


Figure 1: a) Conventional triangulation set-up. The triangulation angle is $\theta = \alpha + \beta$. Usually, either α or β is null. Here, the profiles are acquired along the x axis and the y axis corresponds to the scanning direction. b) Influence of the triangulation angle θ on the resolution Δz for height measurement. $\alpha = 0$ and $\Delta x = 20 \mu\text{m}$. Manufacturers usually use or recommend a value of around 30 degrees.

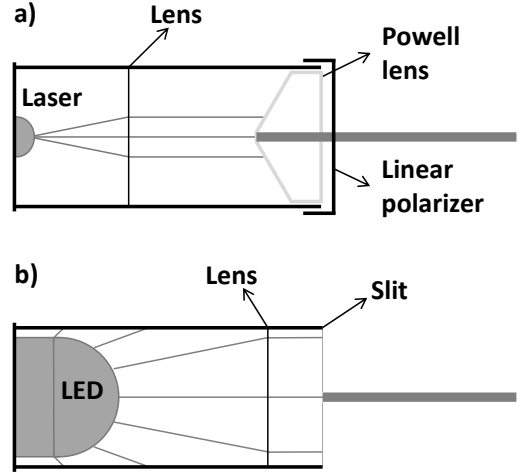


Figure 2: Laser line building method (a): In the tested projector, the laser beam is transformed into a mostly uniform line by a Powell lens. The fan angle of the line and its length are given by the geometry of the lens. LED line building method (b): One or more LEDs generate a beam that goes through the thin slit to be focused on the desired plane.

(W) of the CMOS integrated in the camera is 11.26 mm and numbers 2048 pixels, and its length is made of 1088 pixels. We use a lens with a standard primary magnification $PMAG$ value of 0.28, according to Eq. 2, thus the pixel pitch of the image is fixed at 20 μm , corresponding to a field of view (FOV) of approximately 41 mm.

$$PMAG = \frac{W}{FOV} \quad (2)$$

We chose the Pentax C5028A-M035 lens with a focal length of 50 mm. The aperture is set to a value of $f/8$ to enable enough light to reach the sensor while preserving the depth of focus, which is 6.8 mm. The triangulation angle is chosen to be equal to $\theta = 30$ deg, as recommended by manufacturers. The camera exposure time is set to 300 μs for the laser and to 700 μs for the LED. Therefore, LED requires longer acquisition time, which appears to be a major drawback in the context of colony

monitoring. In addition, with the laser, we use a built-in parameter of the camera called low compression - high dynamic range, that increases the dynamic range of the pixels to prevent saturation.

The camera we used in our tests includes a 3D processing software for triangulation based height estimation (Fig. 3). It takes as input the images of the line on the object. The purpose of the algorithm is to track the line in the image column by column by detecting the maximum of intensity. Since the line is distorted according to the surface topography, it is then possible to estimate its height.

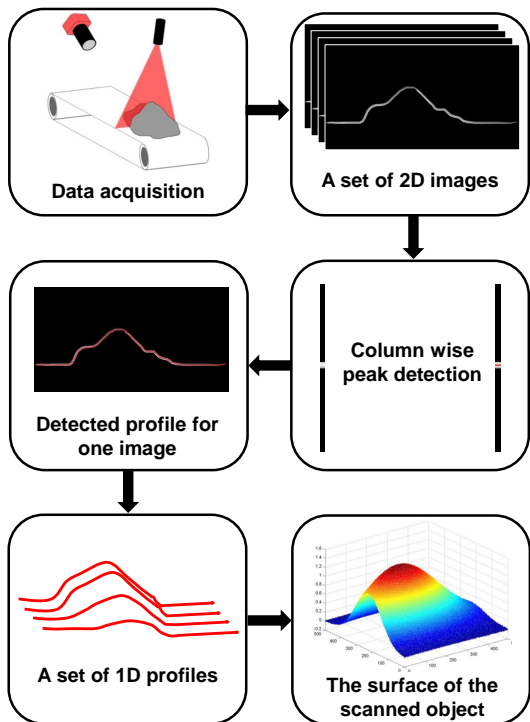


Figure 3: Algorithm flowchart, from the object to the 3D surface data.

2.2. Characterization of the system

In triangulation based 3D measurement methods, the resolution of the optical system is proportional to the size of the light pattern: the spot diameter or in our case, the line

width. In addition, the height estimation is based on fitting a Gaussian function to the column data. Therefore, a better estimation of the surface topography is achieved when using a sharp line with a Gaussian profile cross-section. It would improve the capability of the system to see small objects, leading to the detection of smaller colonies. Colonies are growing with the time, hence, if it is possible to observe them when they are smaller, it would be possible to reduce the required incubation period, which results in time and money savings. Following experiments are dedicated to the study of LED and laser lines and especially their width and profiles.

Those profiles are shown in Fig. 4. The speckle creates random peaks in the laser profile, causing poor Gaussian fitting, maximum localization and finally height estimation. Conversely, the LED line has a smooth, nearly Gaussian profile. Therefore it fits the triangulation application better than laser.

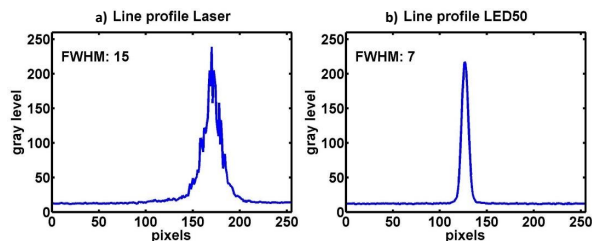


Figure 4: Cross-sections of the laser (a) and the LED (b) lines, taken at the center of the CMOS. Speckle is responsible for random peaks on the laser profile. The laser line is wider than the LED's, as its *Full Width at Half Maximum* (FWHM) is doubled. The surface on which the line is reflected is a porous membrane, as used in next experiments.

We confirm those results with a characterization of the profiles. It is done using a knife-edge experiment, where a blade is moved step-by-step as described in Fig. 5a. This experiment shows the irregularities of the laser data due to the speckle noise (Fig. 6a). LED acquisition (Fig. 6b) again shows a very regular sig-

nal. This experiment also gives an estimation of the width of the line. With a width of 0.28 mm compared to 0.53 mm , it confirms that the laser line is almost twice as wide as the LED line.

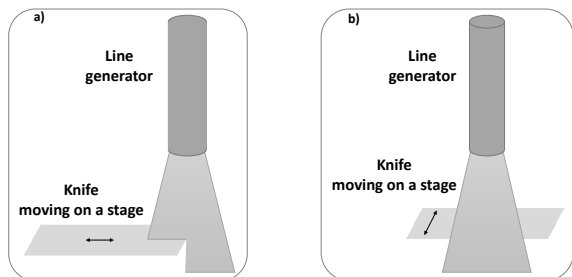


Figure 5: Schematic of the knife experiments, with the knife edge moving perpendicular (a) or parallel (b) to the light line axis. A blade was translated step by step (here a $5\ \mu\text{m}$ step was used) so as to shadow a portion of the light. An acquisition is made at each step. In the configuration of (a), we compute the amount of light received by the CMOS column by column. In the configuration of (b), the amount of light is estimated for each acquisition on the full sensor.

The two measurements of the line profile give an estimation of the instrument point spread functions (PSF) in the direction perpendicular to the line (columns of the CMOS). This might be used for noise reduction by deconvolving the acquired image with this PSF.

The lines generated with both laser and LED are not totally homogeneous, which might result in wrong height measurements. We study the quality of the line using another configuration of knife experiment as shown in Fig. 5b to measure the light distribution along the lines. The results are shown in Fig. 7 for the laser and the LED. The central section shows a linear behaviour with low residual in both cases, corresponding to homogeneous light distribution. This result gives the portion of the line that can be used for robust measurements. The laser is clearly better, because its length is 1.5 times longer. Therefore, a larger area is acquired at each scan, and the whole surface is covered faster because it requires less scans. It results

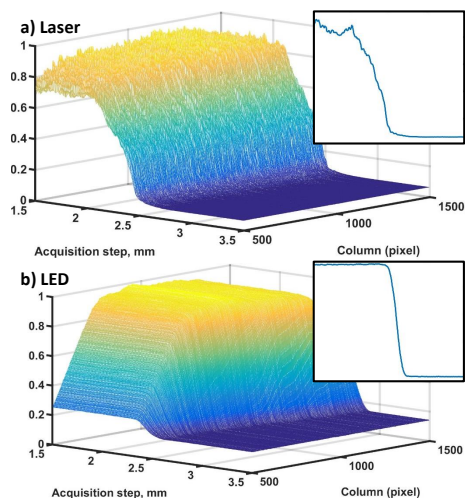


Figure 6: Measured light intensity (normalized) for profile study based on knife experiment, (a) with laser and (b) with LED. Top-right figures emphasize the intensity profile of one column of the CMOS, corresponding to a pixel taken in the center of the CMOS. The two profiles are displayed with same axis scale. The laser line is 0.53 mm width and the LED line is 0.28 mm .

in a scanning system with higher throughput, especially for large agar plates. Conversely, the curvature at inflexion points is higher for the LED, meaning that the light distribution is more abruptly decreasing at both ends. Therefore, lines with the same length offer a larger effective region in the case of the LED, while keeping a robust height estimation. Regarding the LED line, it is also visible in Fig. 6 that only the central part has homogeneous behaviour. A clear decrease of light intensity is visible at the extremity of the line, which justifies the recommendation to use only 80% of the line for measurement.

The system characterization has brought us to the conclusion that LED line presents advantages for 3D imaging of microbial colonies. First, it does not create speckle. Second, it has a Gaussian-like profile cross-section, thus it fits the algorithm for height measurement. Those two characteristics drive to a signal of better quality in which small colonies are easier to discriminate from image background. The main

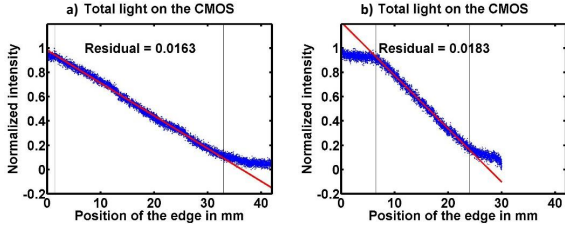


Figure 7: Measured light intensity from the knife experiment, (a) laser, (b) LED. Only the central section of the acquisition (limited by the vertical lines) is taken into account for linear fitting and residual calculations. The residual corresponds to the mean absolute error between the data and the estimated linear function, in that central portion of the line.

drawbacks of LED line are its lack of intensity and reduced scan area. The first has to be compensated by increasing the camera exposure time. As a result, the acquisition rate with a LED is twice as long as with a laser in these experiments. For the scan area, it can be increased by using two lines instead of one. In the following, we will report how the differences between laser and LED impact the measurement quality.

3. Acquisitions

In this section, we compare acquisitions obtained with laser and LED lines. The comparison of the lines themselves has led us to the conclusion that LED light is better suited to triangulation applications, nonetheless we want to evaluate how it impacts the acquisition quality. A first experiment is designed to study the response of the surface alone. In a second experiment, we characterize the system by adding calibrated objects on the surface. Finally, we do a third experiment in real conditions, with micro-organisms.

3.1. Acquisitions on a raw surface

In order to compare the acquisitions in terms of noise, we scan a surface made of polyvinylidene fluoride (PVDF) with $0.45 \mu\text{m}$ pores size

with our system, using LED and laser lines. That surface corresponds to a membrane commonly used for micro-organisms monitoring. Before the acquisition, sterile water is filtrated through the porous material. The acquisitions are made profile by profile. At each scan step, the acquisition is repeated 1900 times for each profile, then the mean is computed. Merging all the mean profiles creates a map of the membrane surface. A $50 \mu\text{m}$ translation in a direction perpendicular to the line is made between each acquisition.

Pre-processing is applied to the resulting map to remove vibratory artifacts and gross shape. They are results of the environment and misalignment between camera, line generator and scanned surface. Such treatment consists first of subtracting the mean column-wise and row-wise. In a second step, the gross shape artifact is reduced by fitting a second degree bi-dimensional polynomial function to the data and subtract the estimated function from them.

Figure 8 shows the results, with height maps and corresponding histograms. The computation of the standard deviation (std) for the laser map (Fig. 8a) gives a value of 0.09. This is almost ten times stronger than the LED map (Fig. 8c), whose std is 0.01, resulting in the loss of surface structures that are visible on the LED data. To reduce the speckle, we apply the well-known Lee filter (Lee, 1980), leading to a clear improvement of the signal as some of the surface structures appear in the filtered laser map (Fig. 8b). Indeed, the standard deviation value shows that the speckle level is reduced by a factor of 3 by means of the Lee pre-processing. Even by doing so, standard deviation remains higher when using laser than when using LED. The histograms show that surface data have near-Gaussian distributions, which permits conventional detection algorithms.

3.2. Acquisitions on a surface with objects

Now that the surface has been studied, we make a comparison between LED and laser

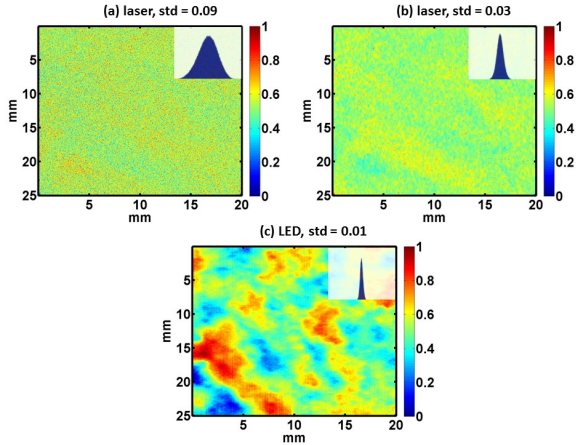


Figure 8: Acquisition of a raw surface with laser (a and b) and LED (c) after pre-processing. In the case of (b), a Lee filter has also been applied to the data. For each map, the corresponding histogram is shown, with same x -axis scale.

ability to spot small objects, in order to evaluate the minimum size of the contaminants that can be detected by the sensor. The contaminants are simulated with polystyrene microspheres (MS) of calibrated diameters (see Tab. 1). Colonies of micro-organisms cannot be considered as spheres, but it is convenient to use MS because it is the closest calibrated object easily available. MS signal might show additional deformation linked to dead-zone and bad-reflection on the inferior part of the sphere that does not exist in the case of micro-organisms.

The process for this experiment is the same as for raw surfaces, except that MS are added to the sterile water. The MS are stopped by the porous material during the filtration process. We perform the same acquisitions and almost the same pre-processing. Only the acquisition step is changed according to the size of the MS. For the laser, a Lee filter is applied to the data to reduce the speckle noise. For the 500 μm MS, the line-column removing step is skipped because the vibratory artifacts can be ignored compared to the size of the MS. Those MS might also move between acquisitions be-

cause they are too big to stick on the surface.

MS ref	MD	$\Delta\sigma$	step
50 μm	52.55	5.09	20
75 μm	75.86	11.58	20
100 μm	98.31	8.27	50
250 μm	255.20	27.50	50
500 μm	530.10	46.39	50

Table 1: Characteristics of the MS given by the manufacturer and acquisition step used for the experiments. MD stands for Mean Diameter and all values are given in μm .

As expected, the raw surface is noisy for the laser, whereas its structure are clearly visible for the LED and for the Lee-processed laser data. The 50 μm MS cannot be seen in the acquisitions while 75 μm are hardly observed like tiny spots of less than two pixels size (Fig. 9a). This size can be considered as the detection range limit for our LED-based system. The case of 250 μm MS (Fig. 9b) is tricky for the laser. Indeed, some objects can be distinguished but hardly identified as MS. We use the ground truth data or the comparison with LED data (Fig. 9c) to locate MS among the visible peaks. Thus, this size can be considered as the detection range limit for the laser-based system. Finally, both laser (Fig. 9d) and LED (Fig. 9e) can detect 500 μm MS. There is a ratio of more than 3 in term of size between the detection limit of the LED compared with the laser. A more precise estimation of that ratio might be calculated with new measurements with intermediate MS sizes. It is finally interesting to observe that the signal corresponding to the MS is the same regardless of the position of the MS along the line, as it can be seen in Fig. 9b to 9e, for both the laser and the LED.

3.3. Acquisition on a surface with colonies

For this paper, the study is limited to micro-organisms colonies whose surface approximately looks like smooth 2D Gaussian.

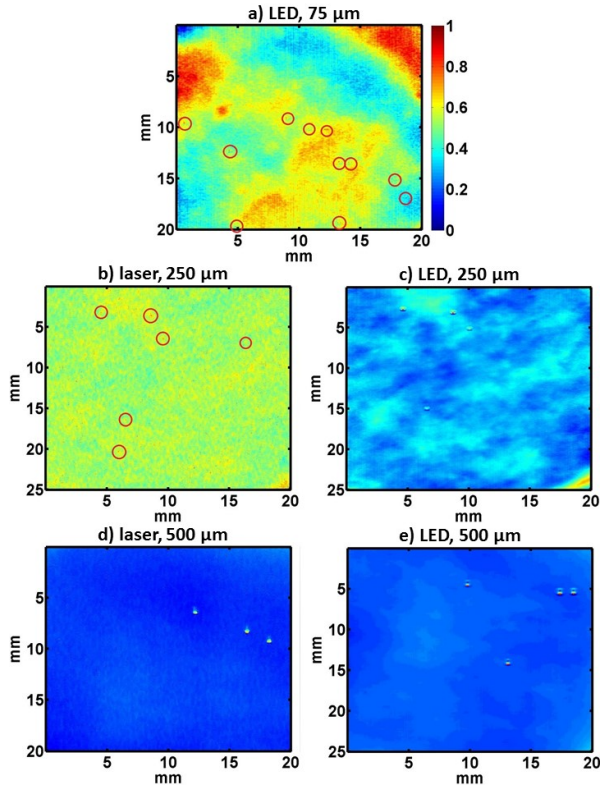


Figure 9: Acquisitions with laser and LED. Calibrated MS of several diameters have been added to evaluate the detection performances of the two lines. (a) shows acquisitions with LED and MS of size $75 \mu m$. The other rows display the acquisitions for the laser on the left and for the LED on the right. Each row corresponds to an MS size: 250 and $500 \mu m$ respectively. At the acquisition corresponding to detection limit, potential MS are highlighted by red circles in the images.

It covers most bacterial colonies and yeasts at early stages of growth. For our tests, we chose a yeast called *Dekkera anomala*, that forms white colonies. This yeast is responsible for the spoilage of beverages like cider, beer or soft drinks (Gray et al., 2011). At each time, laser and LED acquisition are performed sequentially. But the generation time of the chosen strain is long enough to ensure that both scans are performed with colonies of the same size. The growth of the yeasts is directly performed in the system as its temperature fits with the growth temperature of the micro-organism, around 22.5 Celsius degrees.

The tested sample is composed of 100 mL of Fluid A artificially contaminated with 15 to 25 CFUs (colony forming units) of *D.anomala*. The suspension is filtrated through the membrane using a manifold and an EZ-Stream vacuum pump. After the filtration, the membrane is transferred on a Sabouraud agar media plate to allow yeasts' growth. To be able to spot exactly the time of growth when the colonies size corresponds to the detection limit of the system (either equipped with LED or laser source), the growth is stopped during the night by placing the agar plate in the refrigerator.

The acquisition step is set at $20 \mu m$. The membrane is scanned after 63 hours, 89 hours (26 hours later) and 95 hours (6 hours later). The time of scan is not regular because colonies have exponential growth and because the temperature might have been lower during the corresponding night. At the first scan (Figs. 10a and 10b), colonies are visible only using the LED. It is only on the third acquisition (Figs. 10c and 10d) that colonies can be identified on the laser scans. Using a LED line instead of a laser line permitted to gain 32 hours.

By means of the comparison with MS acquisitions, we evaluate the size of the colonies. The $75 \mu m$ diameter MS has a size of 18×18 pixels and the colonies are measured at 13×12 , 16×15 and 17×16 pixels respectively. As far as we can model the signal of a colony by the sig-

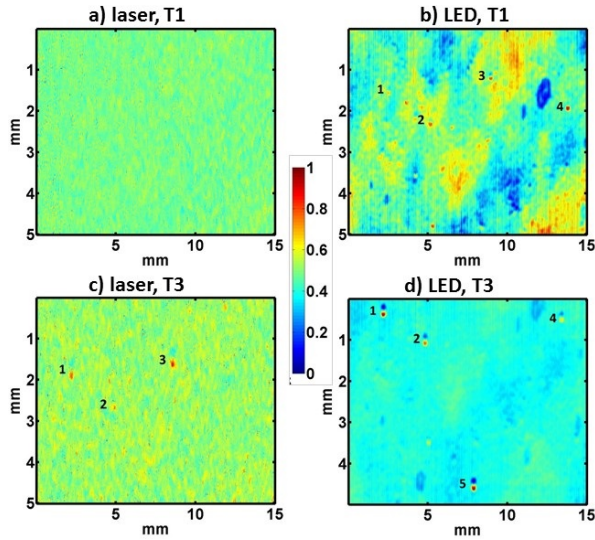


Figure 10: Acquisitions with laser and LED on micro-organisms. The surface is not moved between acquisitions but y -axis offsets can be noticed due to the changes between laser and LED line source. We can see the acquisitions with the laser on the left and with the LED on the right. Each row corresponds to an acquisition time, T1 = 63 hours and T3 = 95 hours after the filtration.

nal of a MS, this results in evaluating the size of the colonies over time at respectively 52, 65 and 69 μm . The laser is able to detect colonies with a 69 μm size whereas it only detects 250 μm MS. Some changes between the acquisitions with MS and with micro-organisms might explain that difference. The first is the change of acquisition step from 20 to 50 μm . Another one is the fact that the membrane is deposited on a culture medium. It means that the membrane is wet and its optical properties are modified. Finally, as discussed in section 3.2, colonies and MS do not have the same shape, thus they create different signals. The colony profile is more like a Gaussian profile, which is more spread on the surface than the spheres. Their surfaces also do not present the same texture, which can influence speckle.

More generally, the image of Fig. 11a demonstrates that the triangulation outperforms the conventional acquisition methods for

cases with low contrast and small objects. It was taken right after the last acquisition. White colonies cannot be discriminated from background (white membrane). However, it is possible to see the colonies with optimized incident light as on Fig. 11b. This is a good alternative for human operators, but, in many cases, the holder is not transparent, thus preventing the membrane from being lit that way. Colonies of micro-organisms can be of many colours and many supports exist (membranes or culture media), which means that configuration with low contrast is a representative case. This would influence the result for a 2D grayscale or color camera but has no impact on the triangulation measurement.

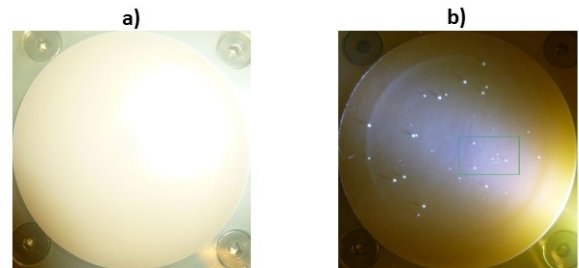


Figure 11: Pictures of the membrane at the time of the last acquisition. (a) is taken in normal light conditions and (b) is taken with low-angle incident light. The green square highlights the zone of the 3D acquisitions.

4. Conclusion

We have investigated a LED based 3D imaging device that permits to detect and observe growing micro-organisms at their very early stage. Because the recorded data are speckle free, the noise level has been estimated to be about 10 times lower than the images formed by laser lighting. As a consequence, the detection threshold has been lowered to approximately 6 times in size when observing artificial samples. As far as micro-organisms are concerned, the present case study reveals that the LED based system could save up to 32 hours

of monitoring which corresponds to about one third of the incubation period. When implemented in a detection platform, we believe that such a time to detection gain would imply time saving and costs reduction in a quality control workflow. Its high signal-to-noise ratio as compared to laser imagery, permits to assess that the system is robust. Time consuming pre-processing such as those devoted to laser images may be avoided. The main drawback of LED based systems is their lack of power when images of dark media have to be formed. With new developments on power LEDs, it is expected that it would be possible to have at our disposal non-coherent sources that are as bright as lasers.

5. Acknowledgments

This research was supported by the French Industrial Agreements on Training by Research (*Conventions Industrielles de Formation par la REcherche - CIFRE*) run by the French National Agency for Research and Technology (ANRT) and co-funded by the European Union, European Regional Development Fund (ERDF). We would like to thank our colleague M. Hohnadel, who provided practical expertise on microbiology.

The work described in this paper is covered by pending patent applications (Felden et al., 2015).

- Berglund, A., Grönlund, A., 2013. An industrial test of measuring saw mismatch using laser triangulation. In: International Wood Machining Seminar.
- Brugger, S. D., Baumberger, C., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U., Mhlemann, K., 2012. Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *PLoS ONE* 7, e33695.
- Businski, M., Levine, A., Stevenson, W., 1992. Performance characteristics of range sensors utilizing optical triangulation. In: Aerospace and Electronics Conference. Vol. 3 of Proceedings of the IEEE 1992 National. pp. 1230–1236.
- Chollet, R., Kukuczka, M., Halter, N., Romieux, M., Marc, F., Meder, H., Beguin, V., Ribault, S., 2008. Rapid detection and enumeration of contaminants by atp bioluminescence using the milliflex rapid microbiology detection and enumeration system. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 16, 256–272.
- Effilux, 2014. <http://www.effilux.fr/files/effilux/notice/notice-EFFI-Lase-Power-continuous-mode-en.pdf>.
- Felden, L., Bouthillon, M., Olivier, S., Whoehl, P., Guesdon, P., Allard, F., 2015. Method for detecting micro-colonies growing on a membrane or an agarose medium of a sample and a sterility testing apparatus.
- Gray, S. R., Rawsthorne, H., Dirks, B., Phister, T., 2011. Detection and enumeration of dekkera anomala in beer, cola, and cider using real-time pcr. *Letters in Applied Microbiology* 52, 352–359.
- Lee, J. S., 1980. Digital image enhancement and noise filtering by use of local statistics. In: *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*. Vol. PAMI-2. pp. 165–168.
- Muralikrishnan, B., Ren, W., Everett, D., Stanfield, E., Doiron, T., 2012. Performance evaluation experiments on a laser spot triangulation probe. *Measurement* 45, 333–343.
- Quest, D., Gayer, C., Hering, P., 2012. Depth measurements of drilled holes in bone by laser triangulation for the field of oral implantology. *Journal of Applied Physics* 111, 013106.
- Rückwardt, M., Göpfert, A., Rosenberger, M., Linss, G., Kienast, S., 2011. A structured led linear light as an economically priced and technical alternative to a laser line generator. In: *Symposium on Photonics in Measurement (20th ISPM)*. Proceedings of the 20th IMEKO TC2.
- Sansoni, G., Trebeschi, M., Docchio, F., 2009. State-of-the-art and applications of 3d imaging sensors in industry, cultural heritage, medicine, and criminal investigation. *Sensors* 9, 568–601.

Bibliographie

- Eva ACOSTA, Sara CHAMADOIRA et Ralf BLENDOWSKE : Modified point diffraction interferometer for inspection and evaluation of ophthalmic components. *Journal of the Optical Society of America A*, 23(3):632–637, 2006. (Cité en pages viii et 14.)
- Robert ADLER : *The Geometry of Random Fields*. Classics in Applied Mathematics. Society for Industrial and Applied Mathematics, 1981. doi :10.1137/1.9780898718980. (Cité en pages 60 et 61.)
- Robert J. ADLER et Jonathan E. TAYLOR : *Random fields and Geometry*. Springer Monographs in Mathematics. 2007. (Cité en page 60.)
- Ola AHMAD, Marine BOUTHILLON, Yoshitane TAKAKURA et Christophe COLLET : Automatic early detection of microbiological contamination from topographic surface roughness using random field modeling. *submitted to IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2015. (Cité en pages 1, 60 et 77.)
- Ola AHMAD et Christophe COLLET : Scale-space spatio-temporal random fields : Application to detection of microbial patterns from images of roughness. 2015. (Cité en pages 78 et 84.)
- F. ARGENTI, A. LAPINI, T. BIANCHI et L. ALPARONE : A tutorial on speckle reduction in synthetic aperture radar images. *Geoscience and Remote Sensing Magazine, IEEE*, 1(3):6–35, 2013. (Cité en page 16.)
- Euiwon BAE, Aroonual AMORNAT, K. Bhunia ARUN, J. Paul ROBINSON et E. Daniel HIRLEMAN : System automation for a bacterial colony detection and identification instrument via forward scattering. *Measurement Science and Technology*, 20(1):015802, 2009. (Cité en pages vii, 11 et 12.)
- R. BARIBEAU et M. RIOUX : Influence of speckle on laser range finders. *Appl Opt*, 30(20):2873–8, 1991. Baribeau, R Rioux, M eng 1991/07/10 00 :00 Appl Opt. 1991 Jul 10 ;30(20) :2873-8. doi : 10.1364/AO.30.002873. (Cité en page 16.)
- Marine BOUTHILLON, Yoshitane TAKAKURA, Ola AHMAD, Luc FELDEN et Christophe COLLET : Led based 3d imaging device to observe colonies of micro-organisms. 2015. (Cité en page 1.)
- Silvio D. BRUGGER, Christian BAUMBERGER, Marcel JOST, Werner JENNI, Urs BRUGGER et Kathrin MUHLEMANN : Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *PLoS One*, 7(3):e33695, 2012. (Cité en page 11.)

- J. CANNY : A computational approach to edge detection. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 8(6):679–98, 1986. Canny, J eng 1986/06/01 00 :00 IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell. 1986 Jun ;8(6) :679-98. (Cité en page 42.)
- Amitabh CHAUDHARY, Alexander S. SZALAY et Andrew W. MOORE : Very fast outlier detection in large multidimensional data sets, 2002. (Cité en page 80.)
- Renaud CHOLLET, Monika KUKUCZKA, Nadine HALTER, Marilyn ROMIEUX, Frederic MARC, Herve MEDER, Vincent BEGUIN et Sebastien RIBAULT : Rapid detection and enumeration of contaminants by atp bioluminescence using the milliflex® rapid microbiology detection and enumeration system. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 16(3):256–272, 2008. (Cité en page 11.)
- M. F. COSTA : Optical triangulation-based microtopographic inspection of surfaces. *Sensors (Basel)*, 12(4):4399–420, 2012. Costa, Manuel F M eng Switzerland Basel, Switzerland 2012/06/06 06 :00 Sensors (Basel). 2012 ;12(4) :4399-420. doi : 10.3390/s120404399. Epub 2012 Mar 29. (Cité en pages viii, 16 et 17.)
- G. CRAGGS, Y. MEURET, J. DANCKAERT et G. VERSCHAFFELT : Characterization of a low-speckle laser line generator. *Appl Opt*, 51(20):4818–26, 2012. Craggs, Gordon Meuret, Youri Danckaert, Jan Verschaffelt, Guy eng 2012/07/12 06 :00 Appl Opt. 2012 Jul 10 ;51(20) :4818-26. doi : 10.1364/AO.51.004818. (Cité en page 16.)
- Luke N. DARLOW, Sharat S. AKHOURY et James CONNAN : A review of state-of-the-art speckle reduction techniques for optical coherence tomography fingertip scans. volume 9445, pages 944523–944523–9, 2015. 10.1117/12.2180537. (Cité en page 16.)
- Richard O. DUDA et Peter E. HART : Use of the hough transformation to detect lines and curves in pictures. *Communication of the ACM*, 15(1):11–15, 1972. (Cité en page 42.)
- Luc FELDEN : Wo/2015/154846 - apparatus and method for removing moisture from a surface in a container, 2015. (Cité en page 52.)
- Luc FELDEN, Marine BOUTHILLON, Ola AHMAD et Christophe COLLET : A method for early detection and identification of microbial-colonies, apparatus for performing the method and computer program. 2015. (Cité en page 1.)
- Luc FELDEN, Marine BOUTHILLON, Stéphane OLIVIER, Pierre WHOEL, Pierre GUEDON et Florian ALLARD : Wo/2015/161914 - method for detecting micro-colonies growing on a membrane or an agarose medium of a sample and a sterility testing apparatus, 2014. (Cité en pages 1, 38 et 49.)
- K. J. FRISTON, K. J. WORSLEY, R. S. J. FRACKOWIAK, J. C. MAZZIOTTA et A. C. EVANS : Assessing the significance of focal activations using their spatial extent. *Human Brain Mapping*, 1(3):210–220, 1994. (Cité en pages 61 et 62.)
- Antoine GILLMANN : *Etude de la survie de contaminants bact eriens modèles d'origine industrielle, isolés d'environnements oligotrophes, et  laboration de milieux synth étiques permettant leur croissance*. Thèse de doctorat, 2015. (Cité en page 5.)

- Alexander G. GRAY et Andrew W. MOORE : 'n-body' problems in statistical learning. volume *Advances in Neural Information Processing Systems* 13, pages 521–527, 2000. (Cité en page 80.)
- IMS HEALTH : Ims health study forecasts global spending on medicines to increase 30 percent by 2018, to 1.3 trillion dollars, 2014. (Cité en page 3.)
- Victoria J. HODGE et Jim AUSTIN : A survey of outlier detection methodologies. *Artificial Intelligence Review*, 22(2):85–126, 2004. (Cité en page 56.)
- J. H. M. JANSSENS, I. FLESCHE et E. O. POSTMA : Outlier detection with one-class classifiers from ml and kdd. In *Machine Learning and Applications, 2009. ICMLA '09. International Conference on*, pages 147–153, 2009. (Cité en pages 59 et 65.)
- Edwin M. KNORR et Raymond T. NG : Algorithms for mining distance-based outliers in large datasets. In Ashish GUPTA, Oded SHMUELI et Jennifer WIDOM, éditeurs : *24rd International Conference on Very Large Data Bases*, volume VLDB'98, Proceedings of 24rd International Conference on Very Large Data Bases, August 24-27, 1998, New York City, New York, USA, pages 392–403. Morgan Kaufmann, 1998. (Cité en page 80.)
- Hans-Peter KRIEGEL, Peer KRÖGER et Arthur ZIMEK : Tutorial on outlier detection techniques, 2010. (Cité en page 57.)
- Hans-Peter KRIEGEL, Matthias SCHUBERT et Arthur ZIMEK : Angle-based outlier detection in high-dimensional data, 2008. (Cité en page 58.)
- R. LAXHAMMAR : Anomaly detection for sea surveillance. In *Information Fusion, 2008 11th International Conference on*, pages 1–8, 2008. (Cité en page 57.)
- Aleksandar LAZAREVIC et Vipin KUMAR : Feature bagging for outlier detection. In *Proceedings of the eleventh ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery in data mining*, pages 157–166. ACM, 2005. (Cité en page 59.)
- Richard LEACH : *Optical measurement of surface topography*. Springer Berlin, 2011. (Cité en pages 16 et 21.)
- J. S. LEE : Digital image enhancement and noise filtering by use of local statistics. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 2(2):165–8, 1980. Lee, J S eng 1980/02/01 00 :00 IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell. 1980 Feb;2(2) :165-8. (Cité en pages 26 et 28.)
- R. LONDON, J. SCHWEDOCK, A. SAGE, H. VALLEY, J. MEADOWS, M. WADDINGTON et D. STRAUS : An automated system for rapid non-destructive enumeration of growing microbes. *PLoS One*, 5(1):e8609, 2010. (Cité en page 11.)
- K. NARSAIAH, S. N. JHA, R. BHARDWAJ, R. SHARMA et R. KUMAR : Optical biosensors for food quality and safety assurance-a review. *J Food Sci Technol*, 49(4):383–406, 2012. (Cité en page 9.)

- V. P. NOSKO : The local structure of a homogeneous gaussian random field in a neighborhood of high level points. *Theory of Probability & Its Applications*, 30(4):767–782, 1986. (Cité en pages 61 et 62.)
- Nobuyuki OTSU : A threshold selection method from gray-level histograms. *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on*, 9(1):62–66, 1979. (Cité en page 66.)
- PHOTONFOCUS : http://www.photonfocus.com/products/camerafinder/camera/?no_cache=1&prid=53, 2014. (Cité en page 19.)
- J. B. POLINE, K. J. WORSLEY, A. C. EVANS et K. J. FRISTON : Combining spatial extent and peak intensity to test for activations in functional imaging. *Neuroimage*, 5(2):83–96, 1997. Poline, J B Worsley, K J Evans, A C Friston, K J eng Research Support, Non-U.S. Gov't 1997/02/01 00 :00 Neuroimage. 1997 Feb;5(2) :83-96. (Cité en page 61.)
- C. K. REKHA, K. MANJUNATHACHARI et G. V. S. RAO : Speckle noise reduction in 3d ultrasound images - a review. In *Signal Processing And Communication Engineering Systems (SPACES), 2015 International Conference on*, pages 257–259, 2015. (Cité en page 16.)
- G. SANSONI, M. TREBESCHI et F. DOCCHIO : State-of-the-art and applications of 3d imaging sensors in industry, cultural heritage, medicine, and criminal investigation. *Sensors (Basel)*, 9(1):568–601, 2009. Sansoni, Giovanna Trebeschi, Marco Docchio, Franco eng Switzerland Basel, Switzerland 2009/01/01 00 :00 Sensors (Basel). 2009;9(1) :568-601. doi : 10.3390/s90100568. Epub 2009 Jan 20. (Cité en pages 13 et 16.)
- D. SCHARSTEIN et R. SZELISKI : High-accuracy stereo depth maps using structured light. In *Computer Vision and Pattern Recognition, 2003. Proceedings. 2003 IEEE Computer Society Conference on*, volume 1, pages l–195–l–202 vol.1, 2003. (Cité en pages viii et 15.)
- Erich SCHUBERT, Arthur ZIMEK et Hans-Peter KRIEGEL : *Generalized Outlier Detection with Flexible Kernel Density Estimates*, pages 542–550. 2014. (Cité en page 59.)
- STATISTA : Revenue of the worldwide pharmaceutical market from 2001 to 2014 (in billion u.s dollars), 2015. (Cité en page 3.)
- S. SUBRAMANIAM, T. PALPANAS, D. PAPADOPOULOS, V. KALOGERAKI et D. GUNOPULOS : Online outlier detection in sensor data using non-parametric models, 2006 2006. (Cité en page 59.)
- You WAN et Fuling BIAN : *Cell-Based Outlier Detection Algorithm : A Fast Outlier Detection Algorithm for Large Datasets*, volume 5012 de *Lecture Notes in Computer Science*, chapitre 111, pages 1042–1048. Springer Berlin Heidelberg, 2008. (Cité en page 80.)
- Michael H.F. WILKINSON et Frits SCHUT : *Digital image analysis of microbes : Imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. 1998. (Cité en page 34.)
- X. ZHAO, C. W. LIN, J. WANG et D. H. OH : Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol*, 24(3):297–312, 2014. (Cité en page 9.)

Marine BOUTHILLON

Dispositif de discrimination entre des micro-organismes et leur environnement pour une détection précoce.

Résumé

Cette thèse consiste en la conception d'un système d'acquisition et d'un algorithme de traitement d'image. Le but de ce travail est la détection de contaminants dans un contexte de contrôle qualité, particulièrement dans l'industrie pharmaceutique. Les contaminants sont des colonies de micro-organismes se développant sur membrane micro-poreuse. Nous avons choisi d'utiliser la mesure tri-dimensionnelle de surface pour réaliser l'acquisition des données, ce qui n'a jamais été fait pour des données micro-biologiques. Notre apport a de plus consisté à remplacer l'éclairage laser généralement utilisé par un dispositif à LED permettant de réduire le bruit dans les données. Cela permet de diminuer la durée d'incubation des tests de 14 jours à moins de 5.

Concernant l'algorithme, nous avons analysé les données de hauteur en combinant une méthode de détection de données aberrantes et un séparateur à vaste marge. La difficulté de la détection réside dans la variété des signaux correspondant aux colonies, et également dans la présence d'artefacts semblables aux colonies. Nous sommes capables de détecter correctement la présence ou l'absence de contaminants dans 98% des cas.

Mots-clé : Détection de contaminants, Microbiologie, Mesure 3D, Triangulation à LED, Mesure de dissimilarité, Classification, Apprentissage

Abstract

An acquisition system and its algorithm are designed. Their purpose is contaminants detection as quality control in pharmaceutical industry. Contaminants are colonies of micro-organisms growing on micro-porous membrane. We use 3D surface measurement, which has never been done in a micro-biological context. In addition, our contribution is to use an LED based lighting instead of a laser. It leads to an important noise reduction. It allows to decrease micro-organisms incubation period from 14 days in current method to 5 days or less.

The height map from the system are processed with an outlier detection method combined to a support vector machine. Colonies show varying and various signals, and artifacts are present in the data. Nevertheless, we have been able to detect with success the presence or absence of contaminants with a rate of 98%.

Keywords : Contaminants detection, Microbiology, 3D measurement, LED based triangulation, Dissimilarity measure, Segmentation, Machine learning