



Thèse

présentée

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Spécialité : Génie informatique, automatique et traitement du signal,
par

Emmanuel DENIMAL

DETECTION DE FORMES COMPACTES EN IMAGERIE : DEVELOPPEMENT DE METHODES CUMULATIVES BASEES SUR L'ETUDE DES GRADIENTS.

APPLICATIONS A L'AGROALIMENTAIRE.

Thèse soutenue publiquement le 28 Mars 2018 devant le jury composé de

Pr Paul Molin, Professeur à l'Université de Bourgogne, France, directeur.

Pr Fan Yang, Professeur à l'Université de Bourgogne, France, Présidente du jury.

Dr Hervé Rigneault, Directeur de recherche CNRS à l'Institut Fresnel, France, examinateur.

Pr John Aldo Lee, Professeur à l'Université catholique de Louvain, Belgique, rapporteur.

Dr Stephane Guyot maître de conférences à AgroSup Dijon, France, examinateur.

Dr. Marco Mora, maître de conférences à la Catholic University of Maule, Chili, rapporteur.

Dr Ludovic Journaux, Maître de conférences à l'Université de Bourgogne, invité.

I. Prologue

CE CHAPITRE PRESENTE MES REMERCIEMENTS ET DEDICACES, UN PLAN DE LECTURE, UNE TABLE DES MATIERES, AINSI QU'UNE TABLE DES FIGURES.

1. Pourquoi faire une thèse ?

Lorsqu'on est étudiant, c'est une suite logique après le Master. Le Doctorat est le diplôme et le grade universitaire le plus élevé et il s'inscrit dans une sorte de continuité « logique » ou « naturelle ». À 45 ans, alors que votre carrière d'ingénieur et votre vie de famille sont déjà bien établies, ça l'est un peu moins. Dans son livre « Le Héros aux mille et un visages » Joseph Campbell (Campbell 1949) décrit le concept de Monomythe du voyage du héros. Je trouve son analyse saisissante de similitudes avec mon parcours. Non pas que je me prenne pour un héros, ça, ça ne vaut encore qu'aux yeux de mes enfants, mais plus pour bien longtemps je le crains...

Dans l'étape deux du Monomythe, l'appel de l'aventure se présente comme un problème ou un défi à relever. Ce défi s'est présenté à moi, alors responsable d'une cellule d'appui informatique, par le biais d'un enseignant chercheur (Stéphane Guyot). Il avait des levures sur lames de Malassez qu'il n'arrivait pas à exploiter. Ce dernier, après avoir interrogé bon nombre de confrères à propos de ses images difficiles à traiter, s'est tourné vers moi et mon collègue Ambroise Marin pour voir ce que nous pourrions en faire. Je ne le savais pas encore, mais Ambroise allait devenir mon compagnon dans cette aventure.

Dans l'étape suivante, J.Campbell annonce que le héros est d'abord réticent, il a peur de l'inconnu. Là, il est clair que l'auteur voit juste. En m'engageant dans cette quête, je me suis senti un peu comme Frodon Sacquet quittant le confort douillet de la Conté (Tolkien 2012) grisé par l'appel de l'aventure humaine et scientifique, mais terrifié à l'idée de quitter un territoire aux frontières rassurantes. Car effectivement, il s'agit bien de sortir de sa zone de confort pour arpenter un chemin tortueux, long et semé d'embûches. Le doctorat est le sommet, le but, la destination, mais le voyage qui y mène est un parcours initiatique. Le principal moteur de la recherche est le désir d'apaiser un doute ou de résoudre un problème. Ce problème a-t-il été déjà résolu ? Suis-je le seul à m'être posé la question ? En suis-je capable ? Est-ce à ma portée ? Ces questions métaphysiques taraudent-elles tous les thésards depuis des générations ou bien est-ce spécifique aux doctorants en pleine crise de la quarantaine ? Inutile d'attendre 7,5 millions d'années que « *Deep Thought* » nous apporte la réponse (Primary Sources Adams 1979). Je présume que c'est le lot commun de la caste des thésards. Quoi qu'il en soit, les années d'études doctorales sont l'occasion d'enrichir et de diversifier ses compétences dans bon nombre de domaines et il n'y a pas d'âge pour cela. Seules l'envie et la motivation comptent et nous en avons.

Mais se lancer dans un tel défi seul est vain. C'est ainsi qu'à l'étape 4 J.Campbell prophétise l'arrivée, dans la vie du héros, d'un mentor, un vieil homme sage, une sorte de Gandalf ou de Dumbeldor (Tolkien 2012; Rowling 1998). Pour moi, tranquillement installé dans ma routine, cette irruption

s'incarne en la personne du professeur Paul Molin. Il a tout l'attirail pour le rôle. La culture, le savoir, les qualités humaines, l'expérience et possède même la magie des sciences mathématiques. Pendant de nombreux mois, Paul, Ambroise et Valérie, ma compagne, me poussent et me pressent. Fin 2015, les planètes sont alignées, l'équipe est au complet, les signes et les oracles sont favorables, il n'y a plus de raison de reculer et je suis à court d'excuses : je dois dire oui.

À l'étape 5, le héros passe le « seuil » de l'aventure, il entre dans un monde extraordinaire, il ne peut plus faire demi-tour. Je m'inscris donc en doctorat en octobre 2015. L'aventure se déroulera alors plus ou moins fidèlement aux étapes suivantes : il y aura des ennemis, des monstres mathématiques à dompter, des abîmes à franchir, des combats épiques contre des hydres tapies dans le plan complexe, mais pour finir nous serons de retours sains et saufs. Et après un périple de deux longues années, vous, lecteurs, serez les témoins et les acteurs de la dernière étape du Monomythe : l'accomplissement.

Je vous souhaite une bonne lecture.

2. Remerciements.

Les remerciements, j'ai toujours pensé que c'était un exercice de style un peu délicat. J'en ai lu des dizaines en cherchant l'inspiration et puis finalement, les miens me sont venus tout naturellement.

Je vais donc commencer par remercier l'ensemble de ma hiérarchie qui m'a permis de mener ces travaux parallèlement à mon travail. Je remercie en premier lieu le Directeur général d'AgroSup Dijon François Roche-Bruyn de m'avoir octroyé une décharge de 20% de mon temps de travail afin de conduire mes recherches. Je remercie ensuite la secrétaire générale d'AgroSup Dijon Madame Le Noan de m'avoir soutenu et avoir cru en moi. Je remercie également ma chef de service et néanmoins amie Laurence Dumas ainsi que l'ensemble de mes collègues du Service Système d'Information qui ont vécu d'une façon ou d'une autre cette odyssée. Je pense en particulier à Annabelle, Thomas, Francis et Yannick.

Je tiens à remercier Patrick Gervais, directeur de l'Unité Mixte de Recherche «Procédés Alimentaires et Microbiologiques» (UMR PAM) qui m'a accueilli au sein de son laboratoire. Je veux également remercier mes compagnons d'aventure, Ambroise Marin, Stéphane Guyot, Ludovic Journaux pour leurs contributions respectives à ce travail personnel qui n'existerait pas sans une équipe ou les idées fusent et s'affrontent dans d'épanouissantes joutes verbales et cérébrales.

Je remercie bien entendu les membres de mon comité de thèse Fan Yang et Hervé Rigneault qui, avec leur enthousiasme et leur bienveillance, ont su insuffler de l'énergie et de l'espoir dans ce projet.

Je veux bien sûr remercier tout particulièrement Paul Molin, mon directeur de thèse qui fut un modèle du genre. Enfin, c'est ce que j'imagine parce que je n'en ai connu qu'un finalement, mais je n'aurais pas souhaité en avoir un autre. Merci, Paul, pour nos échanges scientifiques, politiques ou métaphysiques. Merci pour ton aide, ton investissement, et pour toute cette aventure qui n'aurait jamais commencé si tu n'y avais pas cru en premier.

Je souhaiterais également, une fois n'est pas coutume, saluer et remercier mes « ennemis ». Sans eux, je n'aurais peut-être pas pu garder ma détermination. Sans leurs piques, j'aurais pu m'endormir et perdre ma vigilance. Merci à vous d'avoir su me garder fort et lucide. Sans vous j'aurais peut-être échoué.

Je veux également saluer ici madame Giroux, qui fut ma professeure de Français en 5e, la pauvre. Elle qui a cru en mon potentiel contre l'avis de ces collègues qui me conseillaient des études courtes... Si elle est toujours de ce monde, je suis sûr que cela lui ferait bien plaisir de voir où tout cela a finalement abouti.

Merci aussi à tous mes proches, à Richard, et en particulier à Valérie qui a subi les récits inénarrables de mes batailles.

Et pour finir trivialement, je vais remercier mes parents sans qui tout cela n'aurait même pas commencé.

3. Dédicace.

À mes enfants : Loris et Lison.

Pour que votre papa soit toujours votre héros.

4. Plan de lecture.

Ce document est composé de 7 chapitres principaux.

Le premier chapitre, intitulé « **Prologue** » est celui que vous êtes en train de lire. Y figurent en particulier la table de matières et la table des figures pour vous permettre une navigation rapide à travers les différentes parties du document. Le lecteur y trouvera également les traditionnels remerciements.

Le second chapitre est celui de l'« **Introduction générale** ». Ce chapitre est consacré à la présentation du contexte de mes recherches. Nous y abordons en particulier l'environnement thématique du laboratoire d'accueil dans lequel se sont accomplis ces travaux et nous posons les bases du comptage cellulaire. Nous précisons également les objectifs que nous nous sommes fixés dans le cadre de cette thèse.

Dans le chapitre suivant intitulé « **Les concepts généraux** », le lecteur trouvera une présentation des différents instruments mathématiques qui seront utilisés ainsi que l'état de l'art dans le domaine de la détection de formes linéaires, circulaires ou quelconques. Sans se prétendre exhaustif, ce chapitre a essentiellement vocation à familiariser le lecteur avec les concepts qui ont servi de base à ma contribution et qui sont manipulés tout au long de ce document. Nous y présentons notamment la transformée de Fourier, la morpho-mathématique, les transformées de Hough linéaire, circulaire et généralisée.

Le chapitre suivant nommé « Présentation du cas applicatif de ces travaux » est celui où nous présentons le matériel expérimental et la matière première de nos travaux, c'est-à-dire les images microscopiques de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur cellule de Malassez. Nous présentons en détail le protocole expérimental ainsi que les difficultés spécifiques liées au traitement de ces images.

Le chapitre « **Les contributions** » constitue le cœur de cette thèse. Il regroupe mes travaux et mes contributions sous la forme de trois articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture. Nous y présentons en début de chapitre la stratégie que nous avons appliquée pour traiter ces images. Nous présentons les deux approches possibles pour aborder le problème de la détection et de la caractérisation de la grille dans les cellules de Malassez, puis nous présentons le premier article qui s'attache à décrire les résultats obtenus avec l'approche fréquentielle. Le second article propose un perfectionnement de la première technique et propose de plus une méthode d'effacement de la grille qui n'altère pas l'image des levures. Le troisième article décrit des modifications de la transformée de Hough circulaire par gradient permettant de réaliser une détection robuste et un dénombrement fiable des cellules de levures sur les images microscopiques acquises pendant l'expérience. Ce

troisième article introduit notamment deux structures de données offrant des possibilités inédites en matière de détection de cercles. Dans cette section figure également un paragraphe consacré à l'apport que peut amener une analyse statistique des accumulateurs.

Le chapitre suivant, « Perspectives et généralisation aux formes quelconques » présentera une synthèse des résultats préliminaires obtenus dans le cas des formes quelconques ainsi que les développements futurs et les voies de recherches ouvertes.

Et enfin le dernier chapitre « **Conclusion** » viendra clore ce travail. Nous y retrouverons un résumé du travail réalisé, les axes suivant lesquels il nous paraît pertinent de le poursuivre ainsi que nos réflexions sur l'avenir de la problématique liée à ce travail, assez atypique dans les thématiques du laboratoire PAM.

5. Table des matières.

TABLE DES MATIERES

I. PROLOGUE.....	3
1. POURQUOI FAIRE UNE THESE ?	5
2. REMERCIEMENTS.	7
3. DEDICACE.....	9
4. PLAN DE LECTURE.....	11
5. TABLE DES MATIERES.	13
6. TABLE DES FIGURES.	17
II. INTRODUCTION GENERALE	23
1. LA DETECTION ET LA VISION ARTIFICIELLE.....	25
2. CONTEXTE DE L'ETUDE.	29
a. <i>Environnement thématique de recherche.</i>	29
b. <i>Pression osmotique et pression hydrostatique</i>	30
c. <i>Importance biologique et relation avec la cellule</i>	30
d. <i>Méthodes de comptage cellulaire</i>	31
3. PROBLEMES POSES PAR LES SYSTEMES DE COMPTAGES.....	44
a. <i>Difficultés propres aux systèmes fluidiques.</i>	45
b. <i>Difficultés liées à l'imagerie.</i>	45
4. OBJECTIFS DE CETTE THESE.....	47
III. LES CONCEPTS GENERAUX	49
1. LA TRANSFORMEE DE FOURIER DISCRETE BIDIMENSIONNELLE APPLIQUEE A UNE IMAGE NUMERIQUE	51
2. LA MORPHOLOGIE MATHEMATIQUE	53
a. <i>L'image binaire.</i>	54
b. <i>La translation</i>	54
c. <i>La réflexion</i>	55
d. <i>La complémentation</i>	55
e. <i>La différence</i>	55
f. <i>L'élément structurant.</i>	55
g. <i>Opérateurs de base et leurs combinaisons</i>	56
3. LA TRANSFORMEE DE HOUGH LINEAIRE	60
a. <i>Principe de fonctionnement</i>	62
b. <i>Application à une image réelle.</i>	66
4. LA TRANSFORMEE DE HOUGH CIRCULAIRE	68
a. <i>Remarque liminaire</i>	68
b. <i>Définition</i>	68

c.	<i>La méthode dans le cas où r est fixé.</i>	68
d.	<i>Cas de cercles multiples de rayon r.</i>	69
e.	<i>Application sur une image réelle</i>	70
f.	<i>Cas où r est variable.</i>	72
5.	LA TRANSFORMEE DE HOUGH PAR GRADIENT	75
a.	<i>La détection des pics</i>	76
b.	<i>Détermination du rayon par calcul d'histogramme</i>	78
6.	LA TRANSFORMEE DE HOUGH GENERALISEE	78
a.	<i>Principe</i>	78
b.	<i>Calcul de la R-Table</i>	78
c.	<i>Usage de la R-Table</i>	79
d.	<i>Exemples et applications</i>	80
IV.	PRESENTATION DU CAS APPLICATIF DE CES TRAVAUX	83
1.	LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL	85
2.	L'OBTENTION DES IMAGES	86
V.	LES CONTRIBUTIONS	89
1.	LA DETECTION ET LA CARACTERISATION DE LA GRILLE	91
a.	<i>L'approche spatiale</i>	91
b.	<i>La stratégie choisie : l'approche fréquentielle</i>	104
c.	<i>Avantage de l'approche fréquentielle dans le positionnement de la grille</i>	124
2.	L'EFFACEMENT DE LA GRILLE DANS LE DOMAINE FREQUENTIEL	125
a.	<i>Pourquoi vouloir effacer la grille ?</i>	125
b.	<i>Article 2 : Effacement de la grille</i>	126
c.	<i>Avantage de l'approche fréquentielle dans l'effacement de la grille</i>	134
d.	<i>Perfectionnement de l'effacement de la grille : suppression de l'effet « queue de comète »</i>	134
3.	LA DETECTION ET LE COMPTAGE DES CELLULES	138
a.	<i>Pourquoi choisir la transformée de Hough par gradient ?</i>	138
b.	<i>Calcul du champ de gradients dans l'image</i>	140
c.	<i>Introduction de nombres complexes dans le processus d'accumulation</i>	142
d.	<i>Introduction des LCL et des UCM</i>	144
e.	<i>Article 3, le comptage des cellules</i>	146
f.	<i>Apport des LCL à la détermination du rayon des cercles</i>	159
g.	<i>Apport des LCL à la recherche des pics : problème des conditions d'arrêt</i>	160
4.	RESULTATS PRATIQUES: LA REPONSE AU PROBLEME INITIAL	167
VI.	PERSPECTIVES ET GENERALISATION AUX FORMES QUELCONQUES	171
1.	TRANSFORMEE DE HOUGH GENERALISEE INVARIANTE EN TAILLE ET ROTATION	173
2.	DETERMINATION DE LA COURBURE EN TOUT POINT DE LA FORME	175

3.	CONSTRUCTION D'UNE NOUVELLE R-TABLE	176
a.	<i>Objection de la courbure constante</i>	177
b.	<i>Objection de la courbure nulle ou infinie : Cas des polygones</i>	177
c.	<i>Le problème de l'échelle</i>	177
d.	<i>Premiers résultats</i>	177
VII.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	179
VIII.	BIBLIOGRAPHIE	187
1.	REFERENCES CITEES DANS LE MANUSCRIT.	189
2.	REFERENCES CITEES DANS LES ARTICLES.....	192
IX.	ANNEXES	195
1.	REPRODUCTION DU RAPPORT DE COMPTAGE MANUEL DE CELLULES DU CTCB	197
2.	DOCUMENTATION TECHNIQUE D'UNE POMPE POUR SYSTEME MICRO FLUIDIQUE.....	203
3.	PLATEFORME DE DEVELOPPEMENT.	204
	RESUME.....	207
	ABSTRACT	207

6. Table des figures.

FIGURE 1 DU TRAITEMENT D'IMAGES A LA VISION	25
FIGURE 2 VOITURES AUTONOMES TESTEES PAR GOOGLE. CONSTRUCTEUR TOYOTA. (D'APRES WAYMO).	26
FIGURE 3 LA "COMPREHENSION DU MONDE" PAR UNE GOOGLE CAR.(D'APRES WAYMO).	26
FIGURE 4 SCHEMA ILLUSTRANT LES RELATIONS OSMOTIQUES ENTRE UNE CELLULE ET LE MILIEU EXTERIEUR	31
FIGURE 5 DIFFERENTS TYPES DE LAMES DE COMPTAGE.	33
FIGURE 6 EXTRAIT DE LA PUBLICATION ORIGINALE DE LOUIS-CHARLES MALASSEZ (BNF)	34
FIGURE 7 HEMATO-CYTOMETRES, LAME DE MALASSEZ.....	34
FIGURE 8 SCHEMA DE LA GRILLE DE MALASSEZ ET PRINCIPE DE PARCOURS VISUEL.....	35
FIGURE 9 LAME DE COMPTAGE DE MALASSEZ VUE SOUS MICROSCOPE.....	35
FIGURE 10 ÉCART DE COMPTAGE INTER INDIVIDUS EN FONCTION DU NOMBRE DE CELLULES.	36
FIGURE 11 ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DES COMPTAGES HUMAINS.	37
FIGURE 12 UNE PIPETTE DE COMPTAGE DE LA MARQUE SCEPTER BASEE SUR LE PRINCIPE COULTER	38
FIGURE 13 SCHEMA DE PRINCIPE D'UN COMPTEUR DE COULTER.....	39
FIGURE 14 CELLOMETER AUTO 1000	40
FIGURE 15: EXEMPLE D'HISTOGRAMME (GAUCHE) ET DE CYTOGRAMME (DROITE) PRODUIT PAR CMF	42
FIGURE 16: PRINCIPE SIMPLIFIE D'UN CYTOMETRE EN FLUX.....	43
FIGURE 17 PRINCIPE DU CENTRAGE HYDRODYNAMIQUE.....	43
FIGURE 18 EXEMPLES D'IMAGES BRUTEES, ICI: LA GALAXIE M31 A DIFFERENTS NIVEAUX DE BRUIT.	46
FIGURE 19 EXEMPLE DE VIGNETTAGE, GRADIENT RADIAL.....	46
FIGURE 20 IMAGE DE TACHES REMANENTES DANS LE SYSTEME OPTIQUE D'UN MICROSCOPE, OBTENUE PAR L'IMAGE MOYENNE DE 100 IMAGES DIFFERENTES.	47
FIGURE 21 IMAGE BINAIRE ET SA REPRESENTATION CHIFFREE	54
FIGURE 22 TROIS POSSIBILITES DE REPONSE AU TEST DE L'ELEMENT STRUCTURANT.....	56
FIGURE 23 EFFET DE L'EROSION ET DE LA DILATATION PAR UN ELEMENT STRUCTURANT	57
FIGURE 24 RESULTAT D'UNE OUVERTURE.	58
FIGURE 25 RESULTAT D'UNE FERMETURE.....	58
FIGURE 26 PRINCIPE DE LA SQUELETTISATION. À GAUCHE IMAGE BINAIRE, AU CENTRE, ILLUSTRATION DE L'ALGORITHME DE LA BOULE MAXIMALE, A DROITE LE SQUELETTE CORRESPONDANT A L'IMAGE BINAIRE DE GAUCHE.	59
FIGURE 27 LES DIFFERENTES ETAPES DE L'ALGORITHME DE "HOLE FILLING" MORPHOLOGIQUE.	60
FIGURE 28 EXEMPLE DE "HOLE FILLING" SUR L'IMAGE BINARISEE DE PIECES DE MONNAIE (D'APRES MATLAB ©)	60
FIGURE 29 DISCRETISATION D'UNE LIGNE DROITE DANS UNE MATRICE DE PIXELS.....	61
FIGURE 30 TRACES DE PARTICULES ELEMENTAIRES DANS UNE CHAMBRE A BULLES ET SURIMPRESSIION DE LIGNES(EN ROUGE) IDENTIFIEES PAR TRANSFORMEE DE HOUGH	61
FIGURE 31 REPRESENTATION EN COORDONNEES POLAIRES D'UNE DROITE DANS LE REPERE (θ, ρ)	62
FIGURE 32 DISCRETISATION DE L'ESPACE DES PARAMETRES	63
FIGURE 33 A TRANSPOSITION DANS L'ESPACE DES PARAMETRES. DROITE: ESPACE IMAGE, 2 DROITES LINE1 ET LINE2 PORTENT 3 POINTS. À GAUCHE, L'ESPACE DES PARAMETRES OU "HOUGH SPACE" LES 3 SINUSOÏDES ISSUES DES 3 POINTS.....	64

FIGURE 34 TRANSFORMEE DE HOUGH DE POINTS ALEATOIRES. À GAUCHE, ESPACE IMAGE, A DROITE, L'ESPACE DES PARAMETRES AVEC LES SINUSOÏDES CORRESPONDANTES.....	65
FIGURE 35 TRANSFORMATION DE HOUGH AVEC DES POINTS GROSSIEREMENT ALIGNES. À GAUCHE, ESPACE IMAGE, A DROITE, L'ESPACE DES PARAMETRES CORRESPONDANT	65
FIGURE 36 TRANSFORMATION DE HOUGH AVEC DES POINTS PARFAITEMENT ALIGNES. À GAUCHE, ESPACE IMAGE, A DROITE, L'ESPACE DES PARAMETRES CORRESPONDANT	66
FIGURE 37 PHOTO D'UN IMMEUBLE (EXEMPLE TIRE DE LA DOCUMENTATION D'OPENCv)	67
FIGURE 38 IMAGE PRESENTANT LES CONTOURS (EN BLANC) DE L'IMAGE ORIGINALE ET LES DROITES DETECTEES GRACE A LA TRANSFORMEE DE HOUGH LINEAIRE (EN ROUGE)	67
FIGURE 39 PRINCIPE DE LA TRANSFORMEE DE HOUGH CIRCULAIRE. CHAQUE POINT DE L'ESPACE IMAGE (GAUCHE) GENERE UN CERCLE DANS L'ESPACE DES PARAMETRES (A DROITE). LES CERCLES DANS L'ESPACE DES PARAMETRES SE CROISENT EN UN POINT QUI EST LE CENTRE ESTIME DU CERCLE DANS L'ESPACE IMAGE (CARRE VERT).	69
FIGURE 40 TRANSFORMEE DE HOUGH CAS DE CERCLES MULTIPLES DE MEME RAYON.....	70
FIGURE 41 IMAGE ORIGINALE (EXEMPLE TIRE DU COURS DE SUJIN PHILIP DE L'UNIVERSITY OF UTAH)	71
FIGURE 42 CONTOURS PRINCIPAUX DE L'IMAGE ORIGINALE OBTENUE PAR FILTRE DE CANNY : SEUIL HAUT = 15, SEUIL BAS = 5.....	71
FIGURE 43 MATRICE D'ACCUMULATEUR POUR RAYON=82 PIXELS	71
FIGURE 44 MATRICE D'ACCUMULATEUR POUR RAYON=72 PIXELS	71
FIGURE 45 CERCLE EXTERIEUR DETECTE	71
FIGURE 46 CERCLE INTERIEUR DETECTE.....	71
FIGURE 47 LA GENERATION D'UNE SURFACE CONIQUE DANS L'ESPACE DES PARAMETRES POUR UN POINT (A,B). UN CERCLE AVEC UN RAYON DIFFERENT SERA CONSTRUIT A CHAQUE VALEUR DE R.	72
FIGURE 48 TRANSFORMEE DE HOUGH POUR LE CAS DES CERCLES DE RAYON VARIABLE	73
FIGURE 49 EXPLOITATION DE LA DIRECTION DU GRADIENT DES CONTOURS POUR REDUIRE LE NOMBRE DE VOTES DANS LA MATRICE D'ACCUMULATION	74
FIGURE 50 PRINCIPE DE LA TRANSFORMEE DE HOUGH PAR ACCUMULATION DE GRADIENT: LES VECTEURS DE GRADIENTS CONVERGENT VERS LE CENTRE DU CERCLE.....	75
FIGURE 51 EXPLOITATION DIRECTE DE LA DIRECTION DU GRADIENT.	76
FIGURE 52 EXEMPLE DE FILTRAGE DE LA MATRICE D'ACCUMULATION PAR UN FILTRE GAUSSIEN.....	77
FIGURE 53 CODAGE D'UNE FORME QUELCONQUE POUR LA TRANSFORMEE DE HOUGH GENERALISEE.	79
FIGURE 54 EXEMPLE D'APPLICATION DE LA TRANSFORMEE DE HOUGH GENERALISEE: A) LA FORME MODELE, B) L'IMAGE OU CHERCHER LE MODELE, C) L'ESPACE DES VOTES REPRESENTÉ EN LOG, D) LA POSITION DU PIC PRINCIPAL DANS L'IMAGE	81
FIGURE 55 AUTRE EXEMPLE D'APPLICATION DE LA TRANSFORMÉE DE HOUGH GÉNÉRALISÉE (A) ORIGINAL CERVICAL SPINE IMAGE; (B) IMAGE AFTER UNSHARP MASKING TO ENHANCE EDGES; (C) IMAGE AFTER EDGE DETECTION, (D) CERVICAL SPINE SHAPE TEMPLATE; (E) HOUGH SPACE VALUES PLOTTED IN 3D; HIGHEST PEAK IS GHT ESTIMATE FOR POSITIONING TEMPLATE IN THE IMAGE; (F) FINAL RESULT, SHOWN BY OVERLAYING GHT-POSITIONED/ORIENTED/SCALED TEMPLATE ONTO ORIGINAL IMAGE. A COMPUTED BOUNDING BOX FOR THE RESULT IS ALSO SHOWN.	81
FIGURE 56 UN MICROSCOPE DU PLATEAU TECHNIQUE DIMACELL.....	86
FIGURE 57 ECHANTILLONS REPRESENTATIFS DE L'HETEROGENEITE DES IMAGES.	87

FIGURE 58 BINARISATION DE L'IMAGE DE LA GRILLE. A GAUCHE IMAGE ORIGINALE, A DROITE IMAGE BINARISEE QUE NOUS LABELISERONS « A »	92
FIGURE 59 UTILISATION DU HOLE FILLING. A GAUCHE IMAGE LABEL B MONTRANT LES 16 PLUS GRANDES ZONES, A DROITE, IMAGE LABEL C APRES LE REMPLISSAGE PAR UN HOLE FILLING DES PETITS TROUS	92
FIGURE 60 DETERMINATION DE LA R.O.I. ET EXTRACTION DE LA GRILLE. À GAUCHE IMAGE D DE LA R.O.I., A DROITE, IMAGE E LA GRILLE ISOLEE VIA D XOR C	93
FIGURE 61 EFFACEMENT DE LA GRILLE. À GAUCHE CELLULES ET RESIDUS DE GRILLE (FLECHES ROUGES), A DROITE CELLULES SEGMENTEES.	94
FIGURE 62 EXTRACTION DES CONTOURS PAR FILTRAGE DE CANNY	96
FIGURE 63 ESPACE DES PARAMETRES DE LA TRANSFORMEE DE HOUGH	97
FIGURE 64 IMAGES DES CONTOURS AVEC, EN SURIMPRESSION ROUGE, LES 11 LIGNES DROITES DETECTEES PAR LA TRANSFORMEE DE HOUGH.	97
FIGURE 65 DETAIL D'UN PIC DANS L'ESPACE DES PARAMETRES. À GAUCHE L'ESPACE DES PARAMETRES, A DROITE, LA DECOMPOSITION DES BARREAUX DE GRILLE EN 4 LIGNES DE CONTOURS PARALLELES PAR LE FILTRE DE CANNY.	98
FIGURE 66 : PROFIL D'UN BARREAU DE LA GRILLE : EN ROUGE VARIATIONS DE NIVEAU DE GRIS D'UN BARREAU DE LA GRILLE, LIGNES BLEUES, PRESENCE D'UN CONTOUR SELON CANNY	98
FIGURE 67 APPLICATION D'UN FILTRE DE CANNY ET TRANSFORMEE DE HOUGH SUR UNE IMAGE. À GAUCHE, L'IMAGE SOURCE, A DROITE, L'IMAGE FILTREE PAR LE FILTRE DE CANNY ET LES LIGNES DROITES DETECTEES PAR LA TRANSFORMEE DE HOUGH EN SURIMPRESSION ROUGE.	100
FIGURE 68 CAS DE DECOMPOSITION DE BARREAUX DE GRILLE EN 6 LIGNES CONDUISANT A MAL IDENTIFIER UN BARREAU (HAUT) ET UNE OU DEUX LIGNES (EN BAS).	101
FIGURE 69 ISOLATION DE LA GRILLE ET DE LA R.O.I. À GAUCHE, L'IMAGE A DES BARREAUX DE LA GRILLE APRES FERMETURE, AU MILIEU, L'IMAGE B DE LA R.O.I. APRES LE HOLE FILLING, A DROITE, L'IMAGE RESULTANTE $C = \text{NOT}(A) \& B$	102
FIGURE 70 DISTRIBUTION DES 137 IMAGES EN FONCTION DU CV	103
FIGURE 71 VALEURS DES CV POUR LES 137 IMAGES TRAITEES AVEC LA TRANSFORMEE DE HOUGH.	104
FIGURE 72 ÉLIMINATION DU BRUIT ELECTRONIQUE. A GAUCHE IMAGE PRESENTANT UN BRUIT DE FOND, A DROITE, APRES ELIMINATION DU BRUIT PAR LE FILTRAGE DE KOVESI	106
FIGURE 73 EXEMPLE D'IMAGES ET LEURS TRANSFORMEES DE FOURIER 2D : INTERVERSION PHASE-MODULE	107
FIGURE 74 A GAUCHE, IMAGE ORIGINALE PRESENTANT UN GRADIENT D'ILLUMINATION ALLANT DU COIN HAUT GAUCHE AU COIN BAS DROIT. À DROITE, LE SEUILLAGE A 50% CORRESPONDANT.....	108
FIGURE 75 SCHEMA DU FILTRAGE HOMOMORPHIQUE	110
FIGURE 76 UN FILTRE HOMOMORPHIQUE, A GAUCHE SA REPRESENTATION 3D, A DROITE UNE COUPE RADIALE AVEC γL LE COEFFICIENT D'ATTENUATION POUR LES BASSES FREQUENCES ET γH LE COEFFICIENT D'AUGMENTATION POUR LES HAUTES FREQUENCES,	111
FIGURE 77 IMAGE TRAITEE AVEC LE FILTRE HOMOMORPHIQUE. À GAUCHE, IMAGE ORIGINALE. À DROITE, RESULTAT DU SEUILLAGE A 50% DE L'IMAGE DE GAUCHE.....	111
FIGURE 78 SCHEMA DE PRINCIPE DE LA DETECTION DE LA GRILLE. (A) IMAGE SOURCE, (B) FFT ET SIGNATURE FREQUENTIELLE DE LA GRILLE, (C) RECONSTRUCTION DE LA GRILLE D'APRES LA SIGNATURE, (D) GRILLE "PROPRE", (E) DETECTION DES LIGNES VIA TRANSFORMEE DE HOUGH, (F) L'OBJET GRILLE POSITIONNE SUR L'IMAGE SOURCE.	113

FIGURE 79 COMPARATIF DE LA PRECISION DU POSITIONNEMENT DES BARREAUX ENTRE L'APPROCHE SPATIALE (HOUGH DIRECT) ET L'APPROCHE FREQUENTIELLE (FOURIER)	124
FIGURE 80 REPARTITION DU RATIO DE LA R.O.I. POUR LES IMAGES ANALYSEES.	124
FIGURE 81 RATIO DE LA R.O.I. SELON LA MARQUE DU FABRICANT DE LA LAME DE COMPTAGE.....	125
FIGURE 82 APPLICATION DE L'EFFACEMENT FREQUENTIELLE DE LA GRILLE.....	134
FIGURE 83 ILLUSTRATION DU PHENOMENE DE QUEUE DE COMETE, CONTRASTE AUGMENTE DE 40%.	134
FIGURE 84 L'ORIGINE DES QUEUES DE COMETES. A) IMAGE SYNTHETIQUE AVEC 3 DISQUES; B) ESPACE DES FREQUENCES PRODUIT PAR LA FFT; C) EN ROUGE, L'EFFACEMENT DES FREQUENCES LE LONG DE DEUX AXES SIMULANT LE FILTRAGE D'UNE SIGNATURE DE GRILLE; D) RECONSTRUCTION DE L'IMAGE LAISSANT APPARAÎTRE LE PHENOMENE DE « QUEUES DE COMETES ».....	136
FIGURE 85 EXTRAIT DE L'ESPACE DES FREQUENCES EN GROS PLAN MONTRANT UNE SIGNATURE D'UNE GRILLE AVEC UNE LEGERE ROTATION (ENVIRONS 4°)	136
FIGURE 86 PRINCIPE DE REDUCTION DE L'EFFET QUEUE DE COMETE. A) MODULES MOYENS SUR LES CERCLES D'ISOFREQUENCES CALCULES A PARTIR DE L'ESPACE DES FREQUENCES, B) MASQUAGE DES CERCLES D'ISOFREQUENCES PAR DES BANDES DE 15 PIXELS DE LARGE LE LONG DE LA SIGNATURE DE LA GRILLE, C) REMPLACEMENT DES VALEURS DES MODULES DANS L'ESPACE DES FREQUENCES, D) RECONSTRUCTION A PARTIR DE L'ESPACE DES FREQUENCES MODIFIE. LE CONTRASTE A ETE AUGMENTE POUR METTRE EN EVIDENCE LES RESTES D'ARTEFACTS.....	138
FIGURE 87 REDUCTION DE L'EFFET QUEUE DE COMETE SUR UNE IMAGE REELLE. A) EFFACEMENT DE LA GRILLE "SIMPLE" PRESENCE D'ARTEFACT QUEUE DE COMETE B) EFFACEMENT DE LA GRILLE OPTIMISE, PRESENCE D'ARTEFACT REDUITE.	138
FIGURE 88 CELLULES DE LEVURES FORMANT UN AMAS ET DEFORMATION DU PERIMETRE DE CERTAINES CELLULES (FLECHES ROUGES). LE FLOU EST DU A LA PRESENCE DE GLYCEROL.	139
FIGURE 89 DERIVEE DU PREMIER ORDRE D'UNE GAUSSIENNE.	141
FIGURE 90 CHAMP DE GRADIENT D'UNE CELLULE FLOUE. LES FLECHES JAUNES INDIQUENT LA DIRECTION DES GRADIENTS, EN ROUGE LE POINT DE CONVERGENCE PRINCIPAL DE TOUS LES GRADIENTS.....	142
FIGURE 91 ILLUSTRATION DU PRINCIPE DE RESONNANCE.	143
FIGURE 92 UTILISATION DE VOTE COMPLEXE. A) IMAGE ORIGINALE, B) ACCUMULATEUR CLASSIQUE, C) ACCUMULATEUR COMPLEXE. D'APRES (CICCONET, GEIGER, ET WERMAN 2015)	144
FIGURE 93 ITERATION SUCCESSIVE DE LA TECHNIQUE DE L'EMPORTE-PIECE. LES X BLANCS SONT LES CENTRES THEORIQUES A TROUVER, LES O BLANCS SONT LES CENTRES EFFECTIVEMENT "VUS" PAR LA METHODE.	144
FIGURE 94 PRINCIPE DE CREATION DE LA "LOCAL CONTRIBUTORS LIST" (LCL)	145
FIGURE 95 PRINCIPE DE LA MATRICE UCM	146
FIGURE 96 CALCUL DE RAYON DANS LE CAS CONCENTRIQUE. A) EN ROUGE, LES CONTRIBUTEURS POUR LE CENTRE 1 B) L'HISTOGRAMME DES DISTANCES RADIALES ET LES LOIS NORMALES AJUSTEES, C) LES CERCLES DETERMINES PAR LES SIGMA DES LOIS NORMALES.	159
FIGURE 97 PIC EMERGEANT D'UN FOND BRUIE DANS UNE MATRICE D'ACCUMULATION.	162
FIGURE 98 SIMULATIONS D'ACCUMULATION ET LEUR DISTRIBUTION DES VALEURS DANS L'ACCUMULATEUR A) ACCUMULATION DE 1500 SEGMENTS, B) DISTRIBUTION DES VALEURS DE LA MATRICE D'ACCUMULATION (CROIX BLEUE) ET MODELE AJUSTE (LIGNE ROUGE),C) ACCUMULATION DE 5000 SEGMENTS, D) DISTRIBUTION DES VALEURS DE LA MATRICE D'ACCUMULATION (CROIX BLEUE) ET MODELE AJUSTE (LIGNE ROUGE),E) ACCUMULATION DE 10000 SEGMENTS, F) DISTRIBUTION DES VALEURS DE LA MATRICE D'ACCUMULATION (CROIX BLEUE) ET MODELE AJUSTE (LIGNE ROUGE).....	164

FIGURE 99 OBSERVATION DE LA DISTRIBUTION DES VALEURS DANS UN ACCUMULATEUR. A GAUCHE, LA DISTRIBUTION DES VALEURS, A DROITE, LA QUEUE DE LA DISTRIBUTION OU SE TROUVENT DES HORSAINS (OUTLIERS EN ANGLAIS)	165
FIGURE 100 DETECTION DE CERCLE ET EFFICACITE DES CRITERES D'ARRETS. A) IMAGE A ANALYSER B) ACCUMULATEUR BRUT A L'ETAT INITIAL, C) 91 CERCLES DETECTES PAR <i>IMFINDCIRCLE</i> (CRITERE D'ARRET=SEUIL SUR VALEUR DU PIC MAXIMUM), D) 4 CERCLES DETECTES PAR NOTRE METHODE (CRITERE D'ARRET = PROBABILITE SUR MODELE DE DISTRIBUTION), E) AJUSTEMENT DU MODELE APRES LA DETECTION DU 4 ^E PIC, IL N'Y A PLUS D' « OUTLIERS ». (ICI $p=10^{-9}$) LA CONDITION D'ARRET EST REMPLIE, F) ACCUMULATEUR APRES LA DECONSTRUCTION DES 4 CERCLES : DES PICS SUBSISTENT, MAIS ILS SONT « STATISTIQUEMENT » NON PERTINENTS.....	166
FIGURE 101 ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DES COMPTAGES HUMAINS & MACHINE (DANNEEL)	167
FIGURE 102 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.	168
FIGURE 103 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.	168
FIGURE 104 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.	169
FIGURE 105 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.	169
FIGURE 106 ENCODAGE D'UNE FORME HORS DU REFERENTIEL IMAGE.....	174
FIGURE 107 GRAPHE SELON MOORE NEIGHBORHOOD. EN ROUGE LA TRACE LE LONG DES PIXELS COMPOSANT LE CONTOUR DE LA FORME, UN GRAPHE DE MOORE.	175
FIGURE 108 REPRESENTATION 3D DE LA COURBURE (BLEU) DE LA COURBE LISSEE (VERT) ET DU CHEMIN INITIAL (ROUGE) D'UNE FORME « CŒUR »	176
FIGURE 109 LE LISSAGE DE SAVITZKY-GOLAY. À GAUCHE EN VERT, APPARITION UNE COURBURE ARTIFICIELLE, A DROITE EN BLEU, REPRESENTATION 3D DE CETTE COURBURE.	177
FIGURE 110 RECHERCHE DE FORMES QUELCONQUES. À GAUCHE LES DEUX FORMES A RETROUVER, A DROITE, L'IMAGE A EXPLORER.	178
FIGURE 111 RESULTATS DES RECHERCHES DES DEUX FORMES : A) ET D) LES PROFILS DE COURBURE B) ET E) LES MATRICES D'ACCUMULATION, C) ET F) LES POSITIONS DES PLUS GRANDS PICS EN SURIMPRESSION DE L'IMAGE ORIGINALE.	178
FIGURE 112 A)ORIGINAL FRAME3 FROM CICCONET DATASET E00, B)CIRCLE DETECTION ON FRAME3 E00 EXTRACTED FROM CICCONET'S MOVIE, C) OUR CIRCLE DETECTION ON FRAME3 FROM CICCONET'S DATASET E00	184
FIGURE 113 VERITES DE TERRAIN ET LA SUBJECTIVITE DE L'EXPERT.	184
FIGURE 114 CLUSTER DE CALCUL DU CCUB	204

II. Introduction générale

DANS CE CHAPITRE, APRES UNE INTRODUCTION SUR LE CONCEPT DE VISION PAR ORDINATEUR, NOUS PRESENTONS D'UNE MANIERE GENERALE LE CONTEXTE DES ETUDES MENEES AU SEIN DU LABORATOIRE DES PROCEDES ALIMENTAIRES ET MICROBIOLOGIQUES (PAM) ET PLUS PRECISEMENT DANS L'EQUIPE PROCEDES MICROBIOLOGIQUES ET BIOTECHNOLOGIES (PMB) SUR LES REACTIONS DES CELLULES A DIVERS STRESS AINSI QUE LEUR INTERET DANS LE DOMAINE DE L'AGROALIMENTAIRE. NOUS PRESENTONS DANS LA SUITE DU CHAPITRE DES OUTILS ET DES TECHNIQUES DE COMPTAGE MANUELLES OU AUTOMATISEES ACTUELLEMENT SUR LE MARCHE ET NOUS TERMINONS PAR UN BILAN DES DIFFICULTES ET DES CONTRAINTES PROPRES A CHAQUE TECHNIQUE.

1. La détection et la vision artificielle.

« Détection de forme compacte en imagerie... » Détection : Action de détecter un objet, un corps ou une substance à l'aide d'un appareil. Autrement dit ici, l'appareil est l'ensemble des techniques de vision par ordinateur. « La vision par ordinateur » aussi appelée vision artificielle ou vision numérique est une branche de l'intelligence artificielle dont le but est de permettre à une machine d'analyser, traiter et comprendre une ou plusieurs images prises par un système d'acquisition. Mais comment définir la vision par ordinateur au-delà de ces mots ? Cette question semble simple et pourtant elle révèle d'énormes difficultés et touche de nombreux champs de recherche. La réponse précise à cette question nous échappe encore. « Voir » c'est, entre autres définitions, discerner et reconnaître les formes, les couleurs et les textures du monde qui nous entoure.

Nous pourrions croire, à tort, que nous avons besoin uniquement de nos yeux pour cela, mais la réalité est différente : nos yeux ne servent qu'à capter le signal contenu dans les rayons lumineux. Ils ne servent pas à en extraire les informations. De plus l'œil humain est une assez mauvaise caméra. Il ne voit les couleurs que sur une toute petite partie de la rétine et la vision périphérique, elle, ne distingue que les mouvements. La reconstruction de l'image, le décodage, la hiérarchisation, la classification et l'interprétation de ces signaux sont toutes des tâches dévolues à notre cerveau. Cela signifie que la vision est l'association entre le sens de la vue et un ensemble de processus cognitifs et culturels, voir Figure 1.

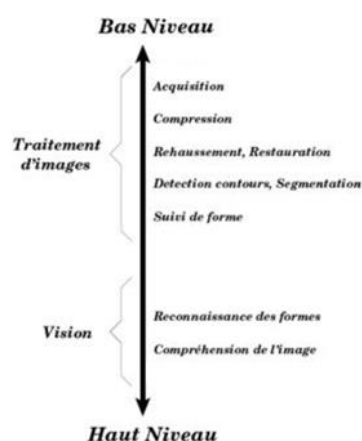


FIGURE 1 DU TRAITEMENT D'IMAGES A LA VISION

Aujourd'hui, grâce aux caméras numériques, nous avons donné le sens de la vue aux machines, cependant, cela ne suffit pas à les doter de capacité de « vision » : il leur manque la capacité à extraire des informations sémantiques des images et des flux vidéo, de manière à analyser et comprendre le monde qu'elles observent et ceci dans différents contextes, voir Figure 1.

Des progrès sont actuellement accomplis dans ce sens chaque jour, en particulier via le domaine du « deep learning », voir par exemple l'article de LeCun (LeCun, Bengio, et Hinton 2015) et aujourd'hui, les plus puissants groupes industriels et de recherche et développement tels que Google, ou les constructeurs automobiles se penchent sur ce problème (Figure 2). Ils nous promettent pour demain des voitures automatiques qui « voient » la route et comprennent leur environnement (partie basse du schéma Figure 1) comme l'affirme Dimitri Dolgov, responsable de l'ingénierie chez Waymo, filiale de Google, dans une interview donnée à « The Atlantic » en 2017 *"Our cars see the world. They understand the world. And then for anything that is a dynamic actor in the environment—a car, a pedestrian, a cyclist, a motorcycle—our cars understand intent. It's not enough to just track a thing through a space. You have to understand what it is doing."*, soit en français : « Nos voitures voient le monde. Elles comprennent le monde. Et pour tout ce qui est acteur dynamique dans l'environnement - une voiture, un piéton, un cycliste, une moto, nos voitures comprennent l'intention. Il ne suffit pas de suivre un objet dans un espace. Vous devez comprendre ce qu'il fait », voir Figure 3.



FIGURE 2 VOITURES AUTONOMES TESTEES PAR GOOGLE. CONSTRUCTEUR TOYOTA. (D'APRES WAYMO).

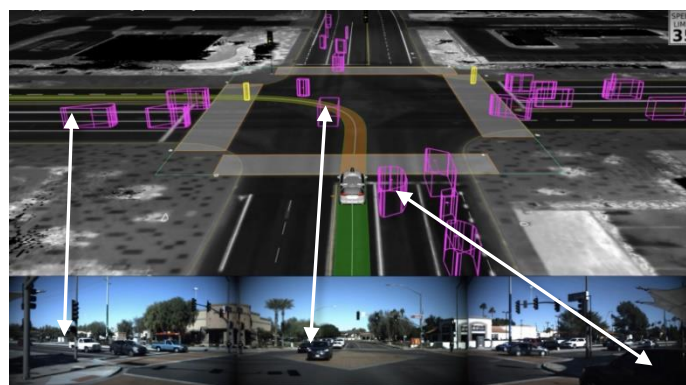


FIGURE 3 LA "COMPREHENSION DU MONDE" PAR UNE GOOGLE CAR.(D'APRES WAYMO).

Cependant, au vu des efforts et des sommes investis, il est toujours aussi démoralisant et tout à la fois fascinant de voir ce qu'un enfant est capable de percevoir et de comprendre du monde dès ses premières années. Montrez-lui un éléphant en photo sur un écran 2D et il identifiera immédiatement

le vrai pachyderme en liberté, en mouvement et en 3D ou même sa schématisation en dessin animé. Idem pour les girafes, les tables, les chaises... Montrez-lui un modèle quelconque, un plateau et quatre pieds et d'un coup tous les modèles de table du monde seront identifiés pour ce qu'ils sont... Et cela sera tout aussi vrai pour quel que soit le modèle, la matière, la taille, une table à trois pieds ou à pied central unique, en maquette de 5 cm ou en dessin. Facile ? Peut-être pour un petit humain, mais pas pour une machine qui ne comprend pas le concept de table et qui pour finir ne comprend pas grand-chose malgré tous nos efforts.

Cela pose ici le problème du sens : pour l'enfant le concept de table a un sens; un sens qui va enrichir sa culture. Cela nourrit également une boucle de rétroaction : sa culture va donner du sens aux objets « vus ». Partir sur la voie de la quête du sens nous conduirait probablement dans une impasse. Cette problématique a été explorée au milieu du XXe siècle par Alan Turing par le biais d'un jeu censé déterminer si une machine est « consciente » ou non (Turing 1950). En énonçant le principe de son test, Turing a su éviter habilement le piège tendu. Il affirme que si une machine a un comportement indiscernable de celui d'un être humain, alors nous devons la considérer comme aussi consciente qu'un humain peut l'être. Il nous invite donc à raisonner uniquement en termes d'efficacité.

Pour nous aider dans cette tâche, nos pairs ont laissé un héritage riche de concepts et de techniques. Les pères fondateurs de l'informatique, Alan Turing et John Von Neuman et des figures centrales du traitement de l'information et des mathématiques comme Joseph Fourier, Paul Hough ou encore Claude Elwood Shannon nous ont fourni de solides bases et des outils puissants. Ces briques élémentaires nous permettent aujourd'hui de résoudre des problèmes complexes tout en ayant l'impression de jouer aux Lego™.

La problématique de recherche qu'est la vision artificielle est à la croisée des chemins entre les mathématiques, le traitement du signal et l'intelligence artificielle.

La révolution apportée par la numérisation des images fixes ou animées qui a eu lieu au cours des 25 dernières années a permis aux mathématiques et à l'informatique d'intervenir massivement sur les images, que ce soit au niveau du stockage, de la production ou de l'analyse. C'est ainsi que maintenant, la plupart des instruments d'observation fournissent leurs résultats sous forme numérique, accroissant substantiellement la productivité de la capture de l'observation. Mais avec l'accroissement exponentiel du volume d'information à traiter, l'automatisation du dépouillement est devenue un problème crucial.

Dans le domaine de la microbiologie, la mise au point d'outils décisionnels et fonctionnels, le dénombrement, la caractérisation et/ou la discrimination de cellules sont des mesures élémentaires pour lesquelles l'exploitation de l'analyse d'image est parfois incontournable. En ce qui concerne le

dénombrement des microorganismes, des dispositifs de comptages appelés cytomètres sont couramment utilisés. Des générations de biologistes ont notamment usé leurs yeux sur les dispositifs de comptage manuel tel que les lames de Malassez. (Figure 5 et Figure 7). Ces opérations de comptage manuel sont en effet le plus souvent laborieuses. De plus, le comptage réalisé par des humains souffre dans certaines conditions d'une variabilité intra-opérateurs (répétabilité) et inter-opérateurs (reproductibilité) non négligeables (en page 197). Le comptage cellulaire permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur une culture cellulaire à un temps T. Selon les besoins de l'utilisateur ou de l'expérience, les résultats obtenus peuvent être décisifs pour la réussite de l'expérience.

De par son rôle crucial en biologie, le dénombrement concerne beaucoup de chercheurs : de 2010 à 2014 plus de 400 articles¹ citent l'utilisation du dénombrement à l'aide de cellules de comptage (ou hémato-cytomètres de Malassez, de Thoma, de Neubauer,...) pour estimer la concentration cellulaire. Différents domaines de la biologie sont concernés, comme l'attestent les exemples suivants : la microbiologie (Philippe, Stanislas, et Claude 2014), l'hématologie (Bargougui, Le Pape, et Triki 2013), la biologie du cancer (Valque et al. 2012), et la biologie marine (Renard 1991). Un tel constat suggère qu'il existe un besoin fort d'automatisation du comptage de cellules. Pour cela, certains appareils numériques couplés aux microscopes et certains dispositifs industriels ont été développés pour aider les biologistes à s'acquitter de cette tâche, mais ils ne sont pas toujours aussi versatiles qu'attendu.

En ce qui concerne la caractérisation des cellules, l'objectif est alors de déterminer leur forme, leur taille ou tous autres critères morphologiques pertinents. Un des enjeux serait d'être capable de catégoriser les micro-organismes sans connaissance a priori pour, par exemple, détecter la présence de polluant bactérien dans une culture de levures.

Le but de ce travail est donc de proposer de nouvelles approches de traitement numérique. Ces techniques doivent être à la fois **robustes** et adaptées à la forte variabilité des images et aux conditions expérimentales extrêmes. L'objectif final est de remédier aux faiblesses liées à la variabilité des comptages humains et à la rigidité des appareils industriels actuellement disponibles. Pour cela, nous devons apprendre à nos machines à « voir » les cellules.

¹ Google scholar, mots clefs :¹ cytometry malassez

2. Contexte de l'étude.

a. Environnement thématique de recherche.

L'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques (PMB) de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) est constituée d'enseignants-chercheurs et autres personnels de différentes disciplines : biologie, microbiologie, virologie, enzymologie, biologie moléculaire et cellulaire, biophysique, génie des procédés microbiologique, informatique, automatique et mathématiques appliquées. Ces compétences sont mises en œuvre pour améliorer la qualité de l'alimentation en élaborant de nouveaux produits et/ou procédés mettant en œuvre des microorganismes sélectionnés ou des procédés innovants de stabilisation et de destruction de flores pathogènes ou d'altération.

Les applications des thèmes de recherche développés dans l'équipe PMB permettent à terme d'optimiser la physiologie cellulaire dans le cas de produits fermentés et d'améliorer leurs qualités (sensorielles, conservation...), d'améliorer la fonctionnalité et la conservation de différents types de microorganismes sous forme sèche, lyophilisée, ou congelée, également de développer de nouveaux procédés plus durables (réduction de la consommation d'énergie). Elles permettent également d'optimiser la destruction de microorganismes au cours de traitements technologiques (séchage, pasteurisation, stérilisation, haute pression) tout en préservant les propriétés nutritionnelles et sensorielles des aliments.

Depuis 1992, l'équipe PMB du laboratoire PAM s'attache en particulier à décrire les mécanismes impliqués dans la survie et la mort de microorganismes soumis à des stress de différentes natures tels que :

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

L'équipe PMB étudie le rôle des mécanismes actifs et passifs impliqués dans la survie et la mortalité lors de l'application de tels traitements (P. Gervais, Marechal, et Molin 1992). Les mécanismes passifs mettent en jeu les propriétés physico-chimiques des constituants cellulaires indépendamment de l'activation des voies de régulations physiologiques aussi appelées mécanismes actifs (P. Gervais et al. 1996). Les principaux mécanismes passifs étudiés au laboratoire PAM rendent compte des changements de structure de la membrane plasmique tels que les variations du volume cellulaire et de la perméabilité membranaire (Patrick Gervais et de Marañon 1995). Actuellement, le laboratoire cherche à estimer la part relative des mécanismes actifs impliqués dans la survie et la mort de cellules

soumises à des perturbations de différentes natures. La compréhension des mécanismes actifs et passifs mis en jeu permettra à terme d'optimiser les procédés de conservation et de destruction des microorganismes (Mille et al. 2004).

Ce travail de thèse contribue aux travaux menés au laboratoire PAM dans le cadre de la compréhension des mécanismes impliqués dans la survie et la mort de microorganismes exposés à un stress osmotique composé d'un régime transitoire (augmentation progressive de la pression osmotique au cours du temps) puis d'un régime stationnaire (maintien de la pression osmotique au cours du temps).

b. Pression osmotique et pression hydrostatique

Les cellules telles que les levures maintiennent leur milieu intracellulaire à une pression osmotique légèrement supérieure à celle du milieu extracellulaire (Martinez de Marañon, Gervais, et Molin 1997). Cette différence dans les pressions osmotiques est définie comme la pression de turgescence ($\Delta P = \Pi_i - \Pi_e$, où i et e représentent respectivement le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire)

La pression osmotique se traduit par une pression mécanique, exerçant une force sur la membrane. Une différence de pression osmotique très grande peut entraîner la rupture de la membrane (cas de la lyse).

À l'inverse, si l'on exerce une pression mécanique (hydrostatique), on peut forcer le passage de solutés à travers la membrane. C'est le principe de l'osmose inverse. L'eau comporte des solutés, particulièrement des sels. Si deux solutions de concentrations différentes sont placées de chaque côté d'une membrane filtre (par exemple la membrane cellulaire), l'eau franchira la membrane par osmose jusqu'à ce que les concentrations s'équilibrent ou que la différence de pression dépasse la pression osmotique (le déplacement d'eau fait diminuer la concentration dans le compartiment où l'eau afflue et la fait augmenter dans le compartiment d'où elle vient). Inversement, en exerçant dans un des compartiments une pression hydrostatique dépassant la pression osmotique, on force l'eau à quitter le compartiment sous pression en dépit de l'augmentation de concentration en soluté qui s'y produit, et de la dilution qui se fait dans l'autre compartiment.

c. Importance biologique et relation avec la cellule

Il existe, en biologie, trois types d'états osmotiques : l'état hypotonique, l'état isotonique, et l'état hypertonique. (Figure 4)

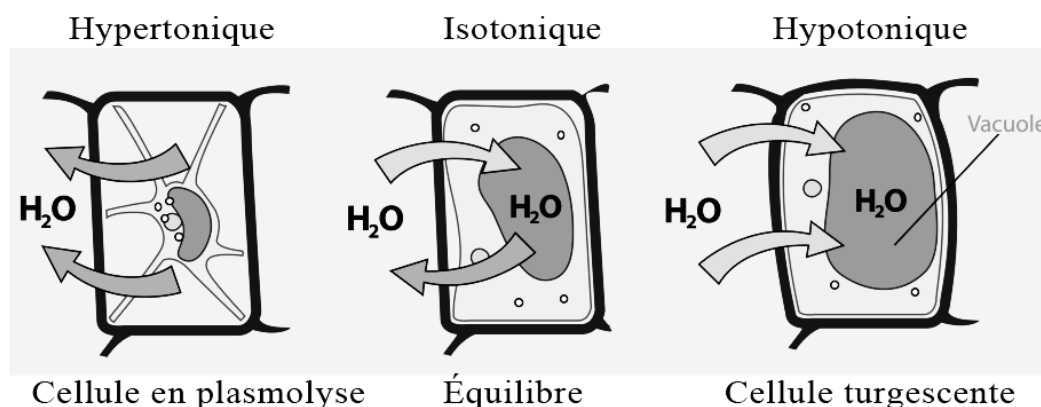


FIGURE 4 SCHEMA ILLUSTRANT LES RELATIONS OSMOTIQUES ENTRE UNE CELLULE ET LE MILIEU EXTERIEUR²

Pour la cellule, l'état hypotonique correspond au moment où la concentration en soluté à l'intérieur de la cellule est supérieure à celle du milieu dans lequel elle évolue. La cellule va absorber du liquide extracellulaire, la pression interne augmente, et va éventuellement la faire exploser : c'est la lyse cellulaire.

L'état isotonique correspond au moment où la solution dans la cellule et son environnement sont équitablement concentrées, la taille de la cellule reste stable et ne fluctue pas.

L'état hypertonique correspond au moment où la solution dans la cellule est peu concentrée en soluté par rapport au milieu dans lequel elle est placée, la cellule va libérer de l'eau vers le milieu et la pression interne de la cellule diminue, la taille de la cellule va faire de même. Si trop d'eau est expulsée, la cellule va mourir par plasmolyse.

L'étude des cellules soumises à ces différentes conditions de pression osmotique présente un grand intérêt en agroalimentaire (P. Gervais, Marechal, et Molin 1992). Ce type d'étude intervient notamment en amont dans l'optimisation de procédés de production, de stérilisation ou de conservation des aliments (Beney et al. 2000). Une des données expérimentales primordiales à recueillir lors de ces expériences est le taux de survie des cellules. Ce taux est obtenu par le comptage « d'évènements »³ dans des solutions de culture cellulaire.

d. Méthodes de comptage cellulaire

Le comptage, ou numération cellulaire, est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide. On exprime le résultat d'un comptage en concentration cellulaire, c'est à dire en unité d'évènements par unité de volume (par ex., nombre de cellules / ml). Le comptage cellulaire s'effectue toujours sur une partie de l'échantillon et jamais sur sa totalité. Pour cela, un

² D'après https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Turgor_pressure_on_plant_cells_diagram.svg

³ Ici on associera un évènement à une cellule.

échantillon de taille précisément définie est prélevé dans la solution à étudier, puis le nombre d'événements présents est compté. Le nombre obtenu est extrapolé au volume total pour estimer la concentration totale.

Le comptage cellulaire fait partie du quotidien du biologiste. C'est une étape obligatoire, parfois fastidieuse, mais incontournable dans l'étude de cultures cellulaires. Elle permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur la culture cellulaire à un temps t . Selon les cas, les résultats obtenus peuvent être décisifs pour l'analyse de l'expérience. Dans les paragraphes suivants, nous allons aborder les méthodes classiques existantes.

La numération cellulaire peut se faire soit par un **comptage manuel au microscope**, soit par un **comptage automatisé** avec des équipements dédiés.

Selon la nature de l'échantillon (lysats de broyage d'organes, suspension d'une culture cellulaire, extrait de sang de patients, etc. ...), le principe du comptage est identique, mais avec les compteurs automatisés des optimisations sont nécessaires pour éviter de surexprimer ou de sous-exprimer la concentration cellulaire. Ces optimisations vont également conduire à des contraintes ou des restrictions.

i. Le comptage manuel

Dans le contexte de la recherche en microbiologie, les hématimètres de type lame de Malassez ou ses homologues que sont les cellules de Thoma, Neubauer et autres (Figure 5) sont couramment utilisés sous l'oculaire d'un microscope pour déterminer la concentration cellulaire (Hibar et al. 2007).

Le comptage manuel est le comptage le plus répandu dans les laboratoires, car il est très facile à mettre en œuvre et nécessite peu de matériel. C'est l'utilisateur lui-même qui choisit de compter ou non certaines cellules. Pour ce comptage manuel, l'expérimentateur a besoin :

- ✓ D'une lame porte objet, généralement en verre épais, dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu et comportant un quadrillage
- ✓ D'une pipette
- ✓ D'un microscope
- ✓ De tampon pour les dilutions
- ✓ D'une solution de culture cellulaire à compter

Les lames utilisées pour le comptage manuel sont des lames spécifiques, en verre ou en plastique. Ces lames sont en forme de porte-objet comme montré Figure 7 :

La partie centrale possède un quadrillage différent selon le type de lame (par ex. : Malassez, Neubauer, Bürker, Fuchs Rosenthal, Thoma, Bürker Türk ou Nageottes) :

- **Les lames Malassez** : généralement utilisées pour le comptage d'échantillons à forte densité cellulaire, tel que le sang. Ces lames permettent le comptage d'une large majorité de types d'échantillons et sont donc les plus répandues en laboratoire.
- **Les lames Neubauer** : dédiées au comptage des érythrocytes et des thrombocytes.
- **Les lames Bürker** : utilisées pour le comptage des leucocytes.
- **Les lames Fuchs Rosenthal** : ont une surface bien plus grande que les autres lames, et sont adaptées pour le comptage d'échantillons tel que le liquide céphalo-rachidien.
- **Les lames Thoma** : plutôt réservées pour le comptage d'hématies et de leucocytes.
- **Les lames Bürker Türk** : est une combinaison des lames Bürker et Thoma.
- **Les lames de Nageottes** : Classiquement utilisé en cytologie urinaire ou pour l'examen du liquide céphalo-rachidien.

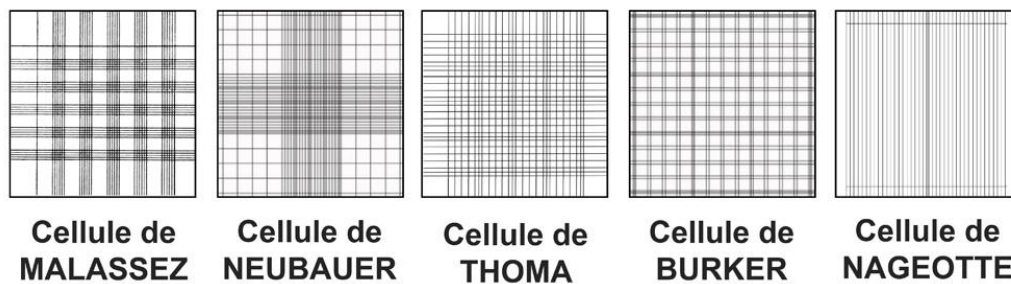


FIGURE 5 DIFFERENTS TYPES DE LAMES DE COMPTAGE⁴.

La lame de Malassez a été inventée au XIX^e siècle par Louis-Charles Malassez (Malassez 1873), voir Figure 6 et Figure 7

⁴ <https://www.labomodern.com/produits/cellulesdenumeration.jpg>

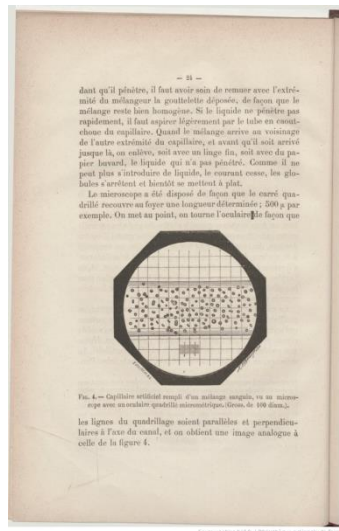


FIGURE 6 EXTRAIT DE LA PUBLICATION ORIGINALE DE LOUIS-CHARLES MALASSEZ (BNF⁵)

Elle est gravée de 100 rectangles, eux-mêmes recoupés en 25 rectangles qui sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 μ l. Voir Figure 8.



FIGURE 7 HEMATO-CYTOMETRES, LAME DE MALASSEZ⁶.

⁵ <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k6281995s/f28.image>

⁶ http://www.sordalab.com/photos/b_photos/b_photo_162_1.jpg

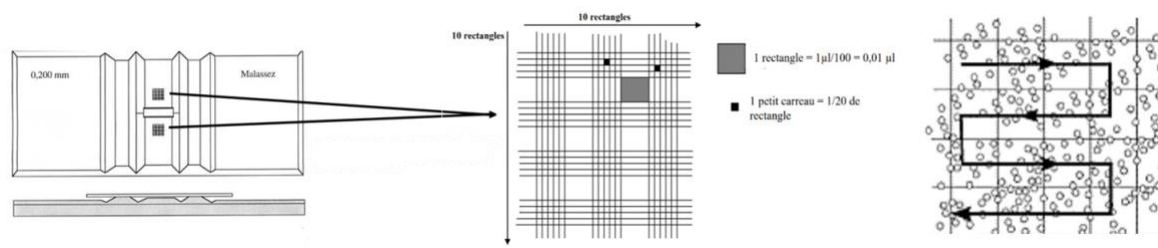
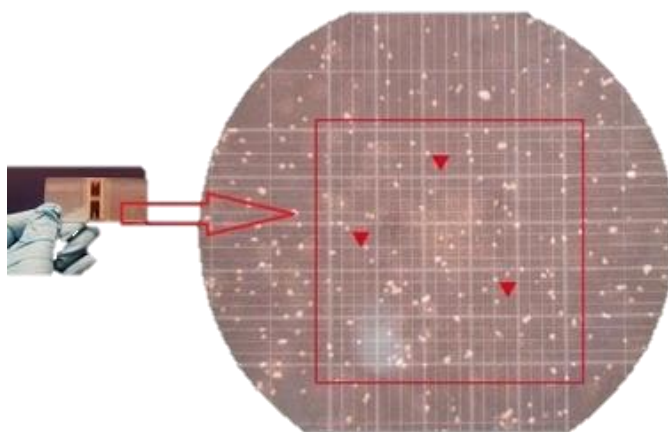


FIGURE 8 SCHEMA DE LA GRILLE DE MALASSEZ ET PRINCIPE DE PARCOURS VISUEL

Pour réaliser le comptage, un volume d'échantillon de la solution à compter (en général entre 10 et 20 μl) est déposé entre la lame et la lamelle au niveau du quadrillage (étalement de l'échantillon par capillarité entre la lame et la lamelle). L'examineur parcourt alors la lame en décrivant un chemin précis et compte les cellules carré par carré de façon à ne rien oublier, voir Figure 8.

Puisque les dimensions de grille sont bien connues, les cellules comptées dans le réseau déterminent directement (Équation 1) le nombre de cellules dans la solution. De plus, compte tenu des caractéristiques de la cellule de Malassez, nous pouvons faire d'ores et déjà une première remarque : la détection et la caractérisation précise de la grille dans l'image microscopique permettent de déterminer une région d'intérêt (Region Of Interest, ROI, Figure 9), mais aussi le facteur d'échelle, sans connaissance préalable des paramètres d'acquisition de l'image tels que l'agrandissement ou le champ de vision. C'est une caractéristique que nous exploiterons pour renforcer la robustesse et l'automatisme de notre technique.

FIGURE 9 LAME DE COMPTAGE DE MALASSEZ VUE SOUS MICROSCOPE⁷

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

⁷ D'après Amrita University

corroborés par des tests que nous avons effectués au sein de l'équipe PMB où nous avons fait compter à la main 10 images de concentration cellulaires variées à 14 personnes. Nous observons Figure 10 une dérive significative des comptages en fonction du nombre de cellules à compter.

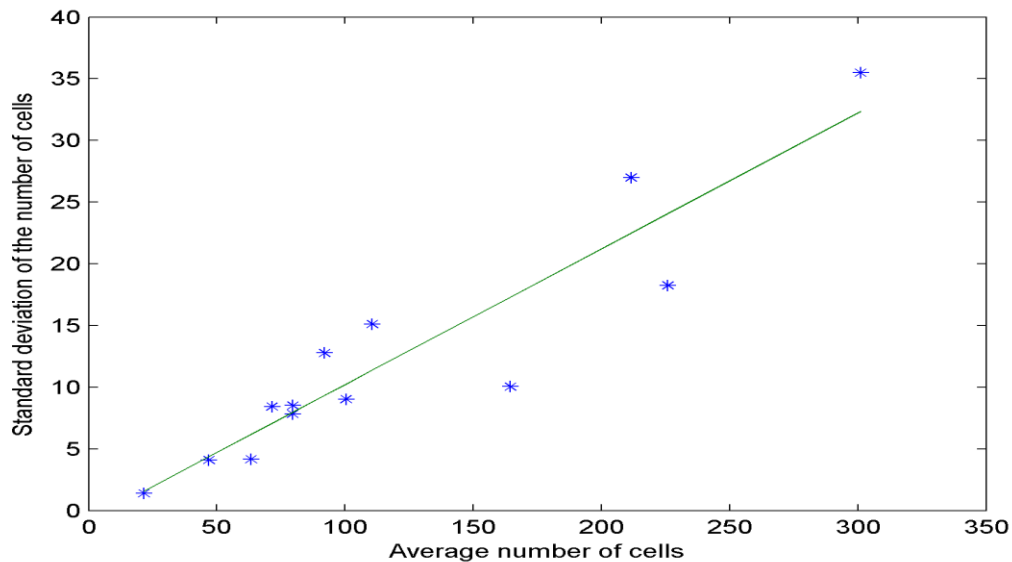


FIGURE 10 ÉCART DE COMPTAGE INTER INDIVIDUS EN FONCTION DU NOMBRE DE CELLULES.

En fonction de la confluence⁸ des cellules dans la suspension cellulaire, il est recommandé de faire une dilution avant le comptage. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution dans le calcul de la concentration totale de la suspension cellulaire.

Une fois la lame chargée, elle est observée sous le microscope. Après la mise au point, on compte le nombre d'évènements sur au moins 4 ou 5 carrés du quadrillage. Le but est de compter environ 100 cellules. Après le comptage, il suffit alors d'extrapoler pour déduire la concentration totale de l'échantillon/suspension cellulaire, suivant la formule :

ÉQUATION 1

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

Formule de calcul modifiée appliquée aux lames de comptage :

ÉQUATION 2

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

⁸ La confluence est un terme de culture cellulaire qui décrit le degré d'écartement entre cellules.

Ce type de comptage manuel, bien que fastidieux, est économique et facile à mettre en place dans un laboratoire.

Bien que la méthode de comptage manuel soit simple et économique, elle a ses limites. En effet, les résultats peuvent varier d'un utilisateur à l'autre comme l'atteste le rapport du Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie Clinique (reproduit en annexe) ou comme le démontre l'analyse du test de comptage Figure 11 que nous avons réalisé au sein du laboratoire.

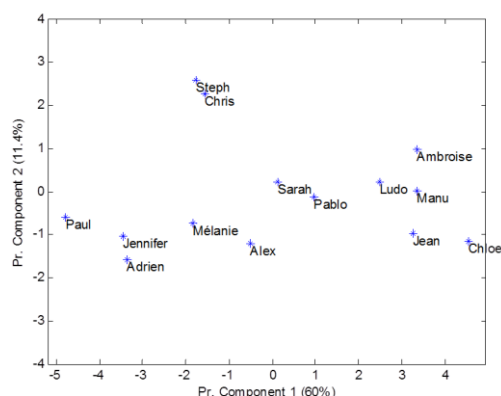


FIGURE 11 ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DES COMPTAGES HUMAINS.

Pour expliquer ces écarts, plusieurs éléments sont à considérer. Le compteur peut être influencé par ses connaissances a priori sur le sujet; et les conditions expérimentales peuvent éventuellement biaiser l'extraction des données (qualité des images). De plus, dans le cas d'une étude à large échelle (grande quantité d'images), il est souvent inévitable de multiplier le nombre d'experts d'où, malgré une standardisation des techniques, des variations d'un expert à l'autre.

La subjectivité de l'expert lors du comptage.

Lors des comptages, faire la distinction entre un débris, une particule ou une cellule s'avère parfois très difficile et ces critères varient beaucoup d'un opérateur à un autre. Ces variations dépendantes de l'opérateur lors du comptage manuel conduisent à des écarts types de mesure importants par comparaison aux valeurs théoriques définies par la loi de Poisson (Nielsen, Smyth, et Greenfield 1991). Cette méthode de comptage peut donc être controversée, car le comptage est peu reproductible d'une lame à une autre ou d'un utilisateur à un autre. Cela nécessite aussi la présence d'un microscope partagé dans la salle de culture, ce qui n'est pas toujours le cas dans tous les laboratoires.

Le coût temporel et humain.

Lorsque l'étude se fait avec un grand nombre d'images (plusieurs centaines), les opérations de comptage font peser une charge importante sur les ressources humaines d'un laboratoire. Les

comptages manuels prennent du temps et mobilisent parfois plusieurs personnes sur ces tâches souvent jugées ingrates et peu intéressantes par les opérateurs. Cela a un coût humain et indirectement financier et ces ressources deviennent souvent des facteurs limitants.

Le comptage cellulaire manuel, non content d'être chronophage, est également imprécis. Or, il est essentiel que ces comptages soient reproductibles. Compte tenu des marges d'erreur admissibles et des contraintes du comptage sur lame, cette méthode de dénombrement reste souvent insatisfaisante.

ii. Le comptage automatisé

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

Le compteur de cellules portatif

Ce type de compteur ressemble à une pipette et est basé sur le principe Coulter, voir Figure 12.



FIGURE 12 UNE PIPETTE DE COMPTAGE DE LA MARQUE SCEPTER BASÉE SUR LE PRINCIPE COULTER⁹

⁹http://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/Scepter%E2%84%A2-2.0-Handheld-Automated-Cell-Counter,MM_NF-C85360

Le principe Coulter a été développé par Wallace H. Coulter en 1940 : il permet de compter et déterminer la taille des particules en se basant sur la mesure d'impédance. Cette technologie a principalement été créée pour compter rapidement des cellules sanguines en mesurant les modifications de conductance électrique lors du passage de ces cellules en suspension dans un fluide conducteur à travers un petit orifice, voir Figure 13.

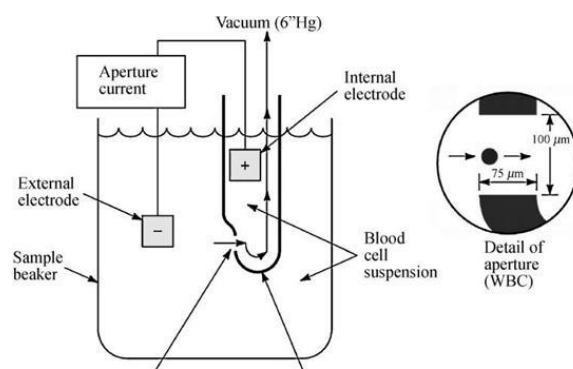


FIGURE 13 SCHEMA DE PRINCIPE D'UN COMPTEUR DE COULTER¹⁰

Sur le compteur de cellules, l'utilisateur installe à l'extrémité de la pipette une sonde, puis va pipeter directement 50 µl de sa suspension cellulaire préalablement diluée si nécessaire. La suspension entre dans la pipette pour être envoyée dans un microcapillaire situé au niveau de la sonde qui détecte chaque cellule *via* le principe Coulter et détermine la concentration cellulaire. Le résultat obtenu est alors affiché sur l'écran de la sonde (cf. photo ci-dessus Figure 12) avec un histogramme montrant la distribution des tailles des cellules.

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

Compteurs automatisés avec imageurs :

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

¹⁰ From John G. Webster (ed.), Medical instrumentation application and design, 4th ed., John Wiley & Sons, 2010.

La suspension apparaît à l'écran, l'opérateur effectue la mise au point sur ces cellules (netteté, temps d'exposition ...) et lance le comptage. L'utilisateur observe qualitativement ses résultats, peut choisir de refaire si nécessaire un comptage pour vérifier la reproductibilité des données, ou effectuer des modifications de paramètres pour optimiser son comptage, voir Figure 14.

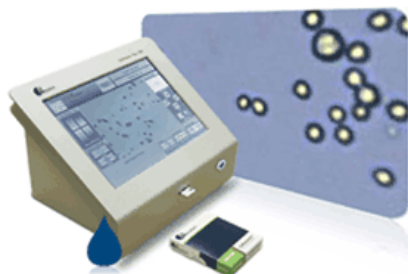


FIGURE 14 CELLOMETER AUTO 1000¹¹

L'acquisition porte sur une centaine d'images qui déterminent le nombre de cellules, la concentration et la viabilité de l'échantillon. Les données obtenues sont des résultats numériques, des histogrammes de distribution des tailles de cellules et des images des cellules. Le fait de visualiser les cellules post-comptage permet de s'assurer que le dispositif n'a pas compté de faux positifs ou des débris cellulaires. En plus des données quantitatives, l'utilisateur a accès à des données qualitatives (viabilité, taille, forme...).

Pour ces compteurs, le volume d'échantillon utilisé peut devenir assez important (environ 500 μ l) auquel il faut ajouter le volume mort et le volume de nettoyage du système fluide. Ce dispositif est donc gourmand en tampon et en échantillon, d'autant plus que le volume utilisé n'est pas réutilisable après le comptage.

De plus, le volume de comptage utilisé et la fluide exigent des étapes contraignantes de nettoyage pour écarter tout risque de contamination.

L'ajout de données qualitatives (visuels, images des cellules comptées, histogramme, viabilité ...) aux données quantitatives a permis de rendre attractif ce type de comptage au vu des avantages :

- Gain de temps
- Meilleure reproductibilité
- Sécurité pour l'utilisateur lors des manipulations (pas de lame en verre)
- Qualité des résultats

¹¹ <http://www.nexcelom.cn/Cellometer-Auto-1000/index.php>

Le bénéfice pour les utilisateurs est alors conséquent : gain de temps, diminution du nombre d'expériences, nombre d'erreurs potentielles minimisé, diminution des faux positifs, et une efficacité de manipulation optimisée.

Que des avantages, ou presque :

Cependant, il est possible d'émettre quelques réserves sur l'aspect « automatique » de ce type d'appareils. En effet, en relisant les paragraphes ci-dessus ou les documentations techniques de ce type d'appareil, nous trouvons çà et là des références à des actions manuelles « *l'expérimentateur effectue la mise au point* » ou bien « *L'utilisateur observe qualitativement ses résultats, peut choisir de refaire si besoin un comptage* ». En réalité, ces appareils fonctionnent bien dans une plage d'utilisation et avec des protocoles strictement définis et ils éludent bon nombre de difficultés liées au traitement de l'image, ce qui les rend peu robustes aux conditions expérimentales particulières, et peu flexibles. Le prix est également un frein possible, car ce matériel coûte approximativement 10000€.

La cytométrie en flux.

Genèse du procédé.

La cytométrie en flux (CMF) est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. Les origines de la CMF remontent à 1934 lorsque (Moldavan 1934) conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans **un fin capillaire** où elles étaient détectées par un capteur photo électrique. Dans les années 1940s, W Coulter a mis au point son appareil permettant de compter des cellules et de mesurer leur taille par variation d'impédance (vu précédemment). En 1953, Crosland et Taylor (Crosland-Taylor 1953) ont utilisé un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire. Ce système a été décrit par Reynolds en 1953. En 1969 Mullaney et Van Dilla (Mullaney et al. 1969; Van Dilla et al. 1969) ont utilisé le laser comme source lumineuse, car il permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation et une stabilité chromatique. L'ensemble est présenté schématiquement Figure 17. Dans les années 70, des chercheurs de Los Alamos et de Stanford ont associé des méthodes de mesure individuelle du volume ou de fluorescence des cellules avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire en fonction de leur état (vivantes ou mortes). De plus, l'étude de la lumière diffuse a permis de discriminer plusieurs types de cellules ce qui a complété la liste des possibilités offertes par la CMF.

Le développement d'appareillages polyvalents a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en flux. L'utilisation des propriétés cellulaires et le développement de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions de la cellule ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations hétérogènes de cellules.

Principes techniques de la CMF

La CMF est définie comme l'étude de cellules isolées **entraînées par un flux liquide**. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou électromagnétiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc.

La CMF est la combinaison de trois technologies :

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

Les signaux mesurés sont essentiellement liés :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à sa structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton...
- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'évènements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés (lumière transmise FS, lumière diffractée SS et gamme de fluorescence FLn, voir Figure 16) et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres ou plus) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées, voir Figure 15.

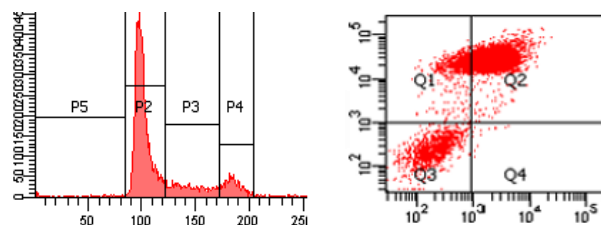


FIGURE 15: EXEMPLE D'HISTOGRAMME (GAUCHE) ET DE CYTOGRAMME (DROITE) PRODUIT PAR CMF

La fonction tri des cytomètres en flux les plus évolués permet de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques.

Les principes de la cytométrie sont résumés dans la Figure 16 ci-dessous.

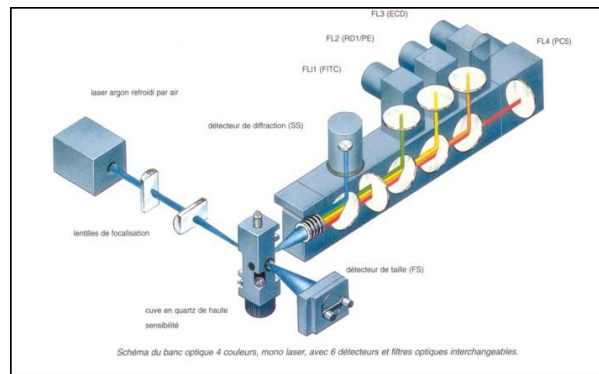


FIGURE 16: PRINCIPE SIMPLIFIÉ D'UN CYTOMETRE EN FLUX.

Préparation des échantillons cellulaires

Les cellules doivent être mises en suspension pour pouvoir être analysées. L'analyse du sang ne pose aucun problème, les cellules étant déjà en suspension. En revanche, les tissus cellulaires doivent être dissociés et les agrégats éliminés afin de pouvoir être analysés.

Le centrage hydrodynamique

Les cellules sont amenées au centre de la buse de mesure et alignées les unes derrière les autres au moyen du système de centrage hydrodynamique de l'échantillon afin d'être excitées une par une avec le faisceau lumineux. Le liquide de gaine subit une accélération progressive qui entraîne un étirement du liquide de l'échantillon et ainsi aligne les cellules au centre du jet, voir la Figure 17.

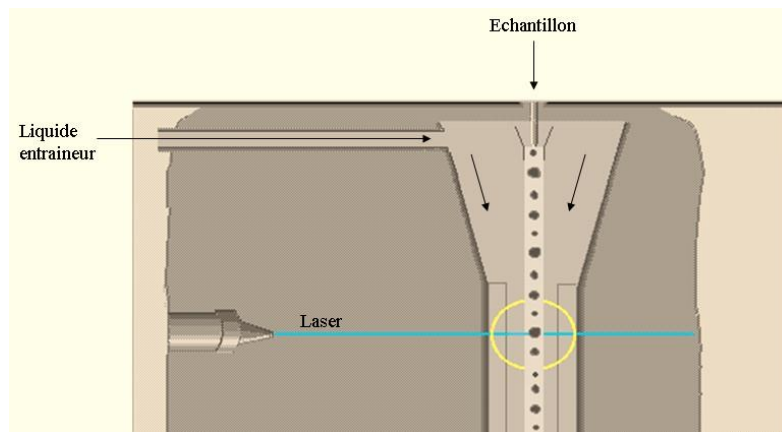


FIGURE 17 PRINCIPE DU CENTRAGE HYDRODYNAMIQUE.

Défilement des cellules

Pour procéder à une analyse individuelle et rapide des cellules, on injecte la solution de culture cellulaire au centre d'une gaine liquide (généralement de l'eau distillée) réalisée par l'intermédiaire d'une buse de 50 à 100µm de diamètre, en utilisant le principe de la focalisation hydrodynamique. Le jet résultant, dont la vitesse varie entre 10 et 30 m/s suivant les appareils, va permettre aux cellules de défiler devant le faisceau laser.

La CMF offre de nombreux avantages dans le domaine de l'étude cellulaire par rapport aux techniques précédentes. (Davey 1996).

Nous pouvons citer notamment :

- Analyses à haute vitesse (jusqu'à 100 000 évènements/s),
- Mesure individuelle sur un grand nombre de cellules,
- Analyse simultanée de paramètres multiples (voir ci-dessus),
- Identification de population hétérogène,
- Tri des populations de cellules prédéfinies (jusqu'à 70 000/s),
- Portabilité (relative) des équipements.

Malgré cela, cette technologie présente tout de même un certain nombre de désavantages parmi lesquels (Davey 1996)

- Instruments très coûteux (50 000€) et sophistiqués;
- Manipulation par un spécialiste hautement qualifié et maintenance permanente par les ingénieurs de service.
- Instruments délicats sujets à problèmes notamment avec le système micro fluide (bouchage) et qui nécessitent également un préchauffage, un étalonnage laser et un nettoyage avant chaque utilisation.
- Perte de l'organisation intercellulaire
- Très peu d'informations sur les distributions intracellulaires.
- Les cellules doivent être en suspension.
- Le nombre de cellules doit être de l'ordre de quelques centaines de milliers au minimum.
- Pas d'image des cellules analysées.

3. Problèmes posés par les systèmes de comptages.

Ce paragraphe expose les difficultés à la croisée des deux disciplines, traitement d'image et microbiologie, concernées par cette thèse. Ceci permettra de cerner les besoins et les limitations à surmonter.

Malgré des années d'évolution des dispositifs numériques associés aux microscopes qui ont permis d'automatiser le comptage des cellules par le biais d'acquisitions et de traitement d'images, dans certains cas applicatifs, les dispositifs industriels de cytométrie échouent. Qui plus est, ces appareils sont très coûteux et requièrent des protocoles très stricts pour fonctionner de manière pertinente. Par ailleurs, les contraintes du terrain, la variabilité des conditions expérimentales où le domaine d'étude,

rendent le comptage automatique de ces suspensions cellulaires par les machines parfois difficiles, voire impossibles, car incompatible avec le protocole exigé par le fabricant.

En résumé, ces appareils fonctionnent correctement pour des séries d'acquisitions standardisées, aux contraintes fortes et parfois coûteuses (ajout de marqueur chimique, de microbilles de calibrations, etc.). Il reste des marges de progrès dans ces domaines et en particulier dans celui du traitement d'image où l'essentiel de la force des détections provient de l'effet de contraste fort (marqueurs colorés, fluorescence) dans des conditions d'acquisitions maîtrisées.

a. Difficultés propres aux systèmes fluidiques.

L'introduction de solutés dans le milieu de culture, pour le besoin de l'expérience, peut modifier sa diffraction et sa viscosité et rendre ainsi celui-ci inutilisable pour le traitement automatique dans un cytomètre. Lors des expériences menées dans l'équipe PMB, les concentrations de glycérol (ou plus généralement de solutés dépresseurs d'activité de l'eau) peuvent être telles que la viscosité des solutions devient considérable. Le pompage de solutés si visqueux dans les microcapillaires d'un système fluide d'un appareil de CMF dépasse de plusieurs ordres de grandeur la capacité des pompes classiques, voir la documentation reproduite en annexe page 203. La pression exercée par les pompes microfluidiques classiques est de l'ordre du kilopascal alors que de telles viscosités nécessiteraient des pressions de l'ordre du mégapascal. Par ailleurs, l'emploi de pompes plus puissantes compromettrait cette fois la résistance mécanique des capillaires.

b. Difficultés liées à l'imagerie.

i. Le bruit de fond

La gestion du bruit est un problème classique de traitement du signal. Selon les appareils et leurs réglages, ce bruit est plus ou moins présent, voir Figure 18. Dans les images que nous sommes amenés à traiter, celui-ci peut se présenter sous la forme d'un bruit d'amplification (l'opérateur ayant trop augmenté le gain de la caméra) ou bien comme un bruit électronique lié au dispositif d'acquisition et de numérisation. Il faut pouvoir atténuer le bruit de fond en altérant le moins possible l'information présente dans l'image, et ce, de préférence automatiquement, l'automatisme devant porter tant sur le fait de quantifier ce bruit que de fixer le seuil de réduction.

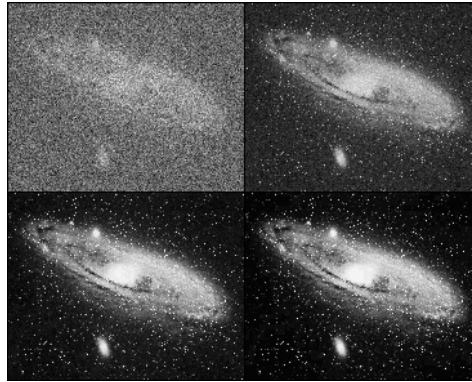


FIGURE 18 EXEMPLES D'IMAGES BRUTEES, ICI: LA GALAXIE M31 A DIFFERENTS NIVEAUX DE BRUIT.

ii. Le gradient d'illumination

Le dispositif d'éclairage des lames sur le microscope peut être positionné de manière à occasionner une illumination non homogène. Selon la qualité des optiques, il peut également apparaître un phénomène de vignettage. Cela se caractérisera par exemple sur l'image par un dégradé radial occupant tout ou partie de l'image, voir Figure 19. Dans ce cas, les opérations de traitements d'images reposant sur des seuillages peuvent être mises en défaut.

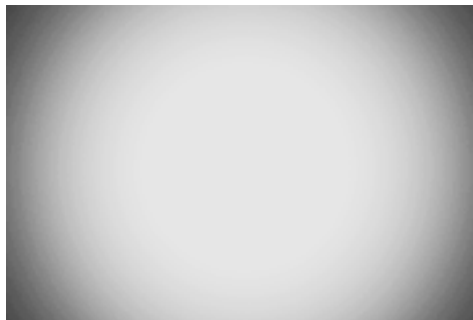


FIGURE 19 EXEMPLE DE VIGNETTAGE, GRADIENT RADIAL.

iii. Les artefacts.

La grille qui constitue une aide et un guide précieux pour le comptage manuel peut malheureusement ajouter une difficulté supplémentaire pour le comptage automatique par traitement d'image. En effet, les cellules peuvent être confondues avec la grille par les algorithmes de traitement simples tels que le seuillage ou d'autres méthodes de segmentation comme ceux couramment présents ou développés avec des logiciels de traitement d'image comme ImageJ (Lehmussola, Ruusuvuori, et Yli-Harja 2006; Cai et al. 2011). D'autres artefacts peuvent être présents, comme des particules non identifiées, des débris divers ou encore des poussières le long du chemin optique ou même sur le capteur CCD lui-même, voir Figure 20. Dans le cas d'une forte concentration cellulaire, les cellules elles-mêmes peuvent

mettre en défaut des algorithmes de segmentation (Kumagai et Hotta 2012). Tous ces défauts compliquent la tâche du traitement de l'image.

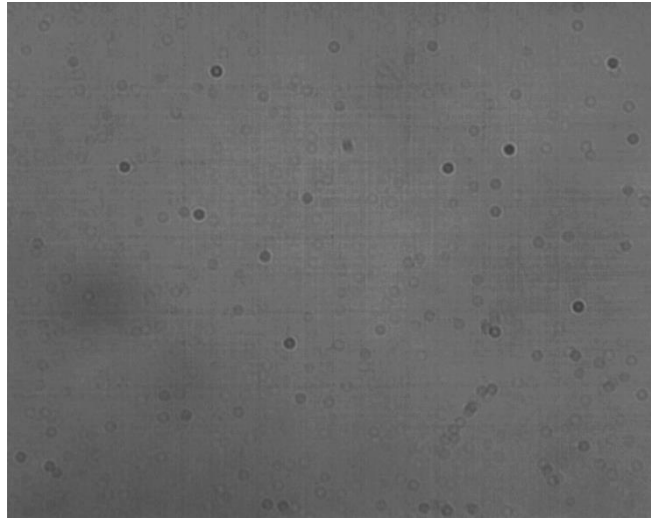


FIGURE 20 IMAGE DE TACHES REMANENTES DANS LE SYSTEME OPTIQUE D'UN MICROSCOPE, OBTENUE PAR L'IMAGE MOYENNE DE 100 IMAGES DIFFERENTES.

4. Objectifs de cette thèse

Ce travail de thèse a pour principal objectif de fournir de meilleurs outils aux chercheurs en microbiologie. En particulier, dans le contexte du laboratoire, nous avons travaillé sur des images de culture de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* lorsqu'elle est soumise à différentes cinétiques de stress osmotique.

Les besoins s'orientent sur plusieurs axes :

- **La standardisation** optimale de l'extraction des informations à travers les techniques de traitement d'image les plus récentes. Cette standardisation doit permettre d'obtenir une plus grande objectivité dans l'acquisition des données microbiologiques ainsi qu'une bonne reproductibilité de la méthode dans le cas d'une étude temporelle ou en comparaison avec d'autres expériences.
- **La robustesse.** Les outils de traitements proposés devront être robustes. Il faut qu'ils soient souples concernant les conditions d'acquisition pour s'adapter aux conditions expérimentales et aux contraintes dérivant de la thématique du laboratoire. Ils doivent s'accommoder de la qualité variable des acquisitions. Cela implique aussi qu'ils devront être tolérants aux perturbations telles que le bruit de fond, les parasites, les artefacts et autres défauts présents dans l'image.

- **L'automatisation maximale** du travail de comptage. Les solutions proposées devront être automatiques autant que faire se peut. Elles doivent éviter au maximum l'intervention de l'utilisateur pour des réglages de seuil ou tout autre paramètre, et doivent permettre une plus grande rapidité d'exécution, une plus grande objectivité, ainsi qu'un gain important de temps et d'argent, en évitant le fastidieux travail de comptage manuel ou l'emploi d'appareillage coûteux et complexe à maîtriser.
- **L'extraction des données pertinentes.** Ces éléments sont de deux types : il faut tout d'abord extraire et caractériser les informations de position et taille de la grille. C'est elle qui définit par sa géométrie les zones de comptage ou R.O.I (Region Of Interest). Ensuite, il faut détecter les cellules de levures, et dénombrer celles qui sont à l'intérieur de la R.O.I.

Les techniques mises en place pour obtenir les résultats de comptage s'étageront en deux phases :

1. Les prétraitements correctifs de l'image (correction du bruit par exemple)
2. Le traitement effectif de l'image pour en extraire les éléments d'informations pertinents pour la problématique microbiologique.

Les outils d'analyse d'images abordés dans le chapitre suivant touchent deux domaines : la reconnaissance de forme et le traitement du signal appliqué aux images.

III. Les concepts généraux

DANS CE CHAPITRE, NOUS PRESENTONS UN ETAT DE L'ART RELATIF AU DOMAINE DE RECHERCHE DE CE TRAVAIL DE THESE. NOUS ABORDONS ICI LES CONCEPTS GENERAUX SUR LESQUELS NOUS NOUS SOMMES APPUYES POUR REALISER CE TRAVAIL ET NOUS PRESENTONS LES OUTILS MATHEMATIQUES ET INFORMATIQUES QUE NOUS MANIPULONS DANS NOS TRAVAUX.

1. La transformée de Fourier discrète bidimensionnelle appliquée à une image numérique

La transformée de Fourier est un outil de traitement du signal puissant qui décompose un signal quelconque (supposé périodique ou rendu périodique) en une somme de sinus et cosinus. Cette décomposition est utilisée dans un large éventail d'applications, telles que traitement des signaux radars, phénomènes optiques et acoustiques et plus généralement tout type de séries chronologiques. Nous la devons à Joseph Fourier, grand mathématicien français.

Ces dernières décennies, l'émergence de la numérisation des images ainsi que l'accroissement spectaculaire de la puissance de calcul de nos machines ont permis l'utilisation massive de la transformée de Fourier bidimensionnelle dans de nouvelles applications¹² tels que l'analyse d'image, le filtrage, la reconstruction d'image ou la compression vidéo.

Comme nous ne nous intéresserons ici qu'aux images numériques en tant que signaux échantillonnés, nous travaillerons naturellement avec la transformée de Fourier Discrète (TFD),(Cooley et Tukey 1965).

L'entrée de la transformée de Fourier est une matrice représentant l'image elle-même. Nous parlerons alors du domaine spatial ou de l'espace image. La sortie de la transformée de Fourier est une matrice de nombres complexes de même dimension, représentant l'espace des fréquences. La période d'échantillonnage T_e est ici de 1 pixel et la fréquence d'échantillonnage f_e sera donc de 1 pixel⁻¹. Nous supposons que les pixels sont carrés. Cela implique que f_e soit la même dans les deux dimensions.

Pour une image de taille $N \times M$, la transformée de Fourier en temps discret (TFTD) bidimensionnelle F est donnée par :

$$F(\omega_1, \omega_2) = \sum_{s=0}^{N-1} \sum_{r=0}^{M-1} f(s, r) e^{-2i\pi(\frac{\omega_1 s}{f_e} + \frac{\omega_2 r}{f_e})}$$

où $f(s, r)$ est l'image discrétisée dans le domaine spatial.

Notons que la TFD ne calcule pas toutes les fréquences qui forment une image, mais seulement un ensemble échantillonné suffisamment grand pour décrire complètement l'image originale. Le nombre de fréquences ainsi calculé correspond au nombre de pixels dans l'espace image. Autrement dit,

¹² Dans les années 80-90, le calcul d'une transformée de Fourier était si lent que certains constructeurs avaient câblé l'algorithme dans des puces pour l'accélérer

l'image du domaine spatial et l'image dans l'espace des fréquences sont de la même taille. La discrétisation des fréquences ω_1 et ω_2 conduit à la TFD :

$$\omega_1 = \frac{k f_e}{N}, k = 0 \dots N - 1$$

$$\omega_2 = \frac{l f_e}{M}, l = 0 \dots M - 1$$

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

La TFD bidimensionnelle est une transformée de Fourier itérée en x et y. En effet, elle peut être écrite comme

$$F(k, l) = \sum_{s=0}^{N-1} G(s, l) e^{-2i\pi \frac{k s}{N}}$$

avec

$$G(s, l) = \sum_{r=0}^{M-1} f(s, r) e^{-2i\pi \frac{l r}{M}}$$

En appliquant ces deux formules, l'image du domaine spatial est d'abord transformée en une image intermédiaire G par le biais de N transformées de Fourier unidimensionnelles. Cette image intermédiaire est ensuite transformée à son tour en l'image finale par le biais de M transformées de Fourier unidimensionnelles.

Il est possible des lors d'opérer diverses opérations de filtrage et de manipulation dans l'espace des fréquences en vue de les répercuter sur l'image originale. En effet, l'image originale peut être reconstruite intégralement par la TFD inverse donnée par :

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

La TFD bidimensionnelle produit en sortie une matrice complexe que nous représenterons avantageusement sous la forme de deux images, l'une étant la représentation du module, et l'autre l'argument (la phase).

Une des propriétés remarquables de la transformée de Fourier 2D est son comportement par rapport aux rotations dans l'espace image. Une rotation d'angle α dans le domaine spatial (autour d'un axe

perpendiculaire aux axes x, y) se traduit par une rotation du même angle α dans le domaine fréquentiel :

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

Cela signifie que la réponse fréquentielle de la TFD 2D comporte une information structurelle sur la direction des périodicités dans l'espace image. C'est une propriété que nous exploiterons lors de nos travaux sur la détection et surtout l'orientation de la grille dans le chapitre « La stratégie choisie : l'approche fréquentielle », page 104

2. La morphologie mathématique

La morphologie mathématique est une théorie développée autour d'un ensemble de techniques mathématiques et informatiques. Elle décrit les fonctions de base utilisées en analyse d'images, pour l'étude des objets, de leur forme, de leur taille, des relations avec leur voisinage en particulier topologiques, de leur texture, et de leurs niveaux de gris ou de leur couleur. Elle a été développée initialement dans un cadre ensembliste, et donc avec des applications directes pour les images en noir et blanc (appartenance ou non appartenance).

Imaginée à l'origine par G. Matheron dans les années 1960-1970 pour l'étude des matériaux poreux (Haas, Matheron, et Serra 1967), la morphologie mathématique fournit des outils pour la reconnaissance des formes. Par les transformations qu'elle propose, elle est souvent employée à différents niveaux du traitement d'images tel que le filtrage, la segmentation, les mesures, ou bien l'analyse de texture. Elle a prouvé son utilité pour différentes applications dans de nombreux domaines, aussi bien 2D que 3D (Combaret et Talbot 2007) en biologie (Gesbert et al. 1990), cytologie quantitative (Meyer 1979), en imagerie médicale, en imagerie aérienne et satellitaire (Valero et al. 2009), etc.

Les opérations morphologiques sont des traitements dans lesquels les limites géométriques des objets sont modifiées. La base de la morphologie mathématique est la théorie des ensembles, où chaque opération de traitement est une succession d'unions et d'intersections d'ensembles (P. Soille 2003; Dougherty et Lotufo 2003). Mais la morphologie mathématique relève tout à la fois de l'algèbre, de la théorie des treillis, de la topologie, des probabilités et de la théorie des ensembles (Birkhoff 1940). Dans les paragraphes suivants, nous n'aborderons pas les fondamentaux théoriques de la morpho-mathématique. Nous adopterons un point de vue plus proche de celui de l'utilisateur d'outils de traitement d'images que du mathématicien. Nous introduirons cependant quelques éléments théoriques élémentaires utiles à nos travaux et auxquels nous ferons référence dans les chapitres

suivants, en particulier dans le chapitre « La détection et la caractérisation de la grille, L'approche spatiale », page 91.

a. L'image binaire.

Une image I peut être considérée comme une fonction f de l'espace $E = \mathbb{Z} \times \mathbb{Z} = \mathbb{Z}^2$ dans \mathbb{R}^n . pour une image monochrome, $n = 1$, pour une image couleur $n = 3$ et pour les images multispectrales $n > 3$. Dans le cas d'une image binaire, n vaut 1 et les valeurs possibles sont limitées à 0 ou 1. C'est le cas le plus traité par la morphologie mathématique.

Soient A et B deux régions complémentaires dans une image binaire en noir et blanc. A et B peuvent être considérés comme deux ensembles tels que $I = A \cup B$ et $A \cap B = \emptyset$, et leurs composants $a = (a_1, a_2) \in A$ et $b = (b_1, b_2) \in B$ sont les pixels à l'intérieur de chaque région. Nous nommons A l'objet à étudier (la forme) et B le fond de l'image tel que

$$A = \{a | f(a) = 1\}$$

$$B = \{b | b \notin A, f(b) = 0\}$$

La forme A peut représenter plusieurs objets (notion de composante connexe); certaines composantes du fond B peuvent alors représenter des trous dans les objets (notion de simple connexité, voir la Figure 21).

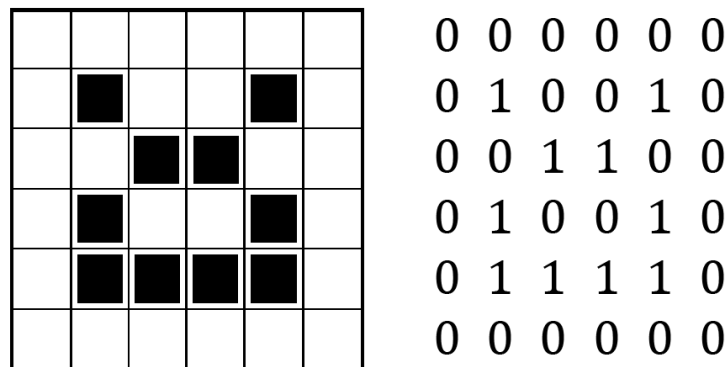


FIGURE 21 IMAGE BINAIRE ET SA REPRESENTATION CHIFFREE

Nous pouvons ensuite définir quelques opérateurs élémentaires pour manipuler et extraire des informations de ces images binaires.

b. La translation

La translation de A par $x = (x_1, x_2)$ pixels comme :

$$A_x = \{c | c = a + x \text{ pour tous } a \in A\}$$

avec

$$c = c(c1, c2) = (a1 + x1, a2 + x2) = a + x$$

c. La réflexion

La réflexion de A se définit comme :

$$\check{A} = \{ G - a | a \in A \}$$

La réflexion s'entend autour d'un point d'origine G , par exemple le centre de la figure A .

d. La complémentation

Le complémentaire de A :

$$A^c = \{ c | c \notin A \}$$

e. La différence

La différence $A-B$ s'écrit :

$$A - B = A \cap B^c$$

f. L'élément structurant.

L'élément structurant est un objet binaire de E . Il est utilisé par certains opérateurs de morphologie mathématique. L'élément structurant définit un voisinage autour de chaque point de l'image et ce sont donc des propriétés locales des objets qui sont ainsi mises en évidence. Il joue en quelque sorte le rôle de modèle local, ou de sonde. Il est déplacé partout sur l'image à traiter, et à chaque position, on étudie sa relation avec l'image binaire. Ces relations peuvent être du type « est inclus dans l'ensemble », ou « touche l'ensemble », par exemple.

Si S est un élément structurant, tous les éléments $s \in S$ sont repérés à partir de l'origine (0,0) de S située en son centre. L'élément structurant peut prendre plusieurs formes : carré, ligne, disque, etc.

Si S est un carré de 5x5

$$s = (s_1, s_2) \quad S / -2 \leq s_1, s_2 \leq 2$$

Cet élément structurant est donc déplacé de façon à ce que son origine passe par toutes les positions de l'ensemble I . Pour chaque position, on pose une question relative à l'union, à l'intersection ou à l'inclusion de S dans A . La réponse sera positive ou négative. L'image des points correspondants à des réponses positives formera un nouvel ensemble qui constituera l'image transformée, voir la Figure 22.

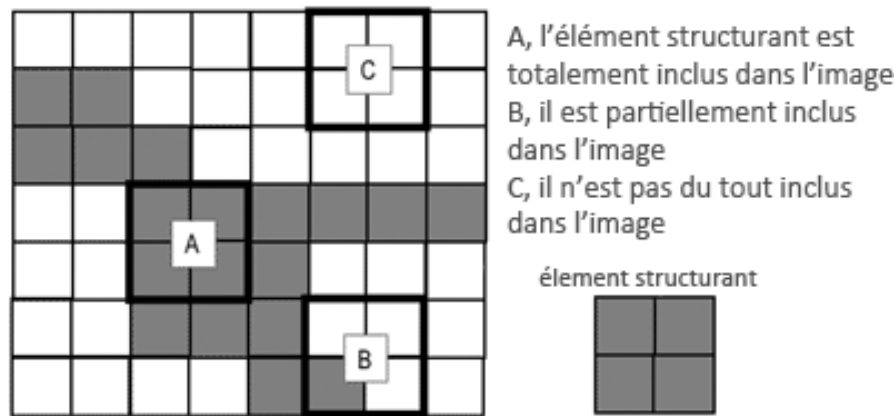


FIGURE 22 TROIS POSSIBILITES DE REPONSE AU TEST DE L'ELEMENT STRUCTURANT.

g. Opérateurs de base et leurs combinaisons

i. La dilatation

La dilatation morphologique de A avec l'élément structurant S peut être définie comme la somme de Minkowski de A par le symétrique \check{S} de S , ou bien de façon plus intuitive:

$$\delta_S(A) = A \oplus \check{S} = \{x \in I / S_x \cap A \neq \emptyset\}$$

La dilatation peut également se définir (P. Soille 2003) en posant la question : Est-ce que l'élément structurant S touche l'objet A ? Les positions de S dans I qui peuvent répondre par l'affirmative feront partie de l'image « dilatée », voir la Figure 23.

Les effets attendus sur l'image seront les suivants : tous les objets vont "grossir" d'une fraction de la taille de l'élément structurant ; s'il existe des trous dans les objets, c'est-à-dire des éléments de fond à l'intérieur des objets, ils seront partiellement ou totalement comblés; si des objets sont séparés d'une distance moins grande que la taille de l'élément structurant, ils seront fusionnés.

La dilatation morphologique n'est pas (sauf cas très particulier) inversible. L'opération dite inverse de la dilatation est l'érosion morphologique.

ii. L'érosion

L'érosion peut se définir (P. Soille 2003) en posant la question : Est-ce que le translaté de l'élément structurant S est inclus dans l'objet A ? Les positions de S dans I qui peuvent répondre par l'affirmative feront partie de l'image « érodée », voir la Figure 23.

L'érosion se définit alors comme :

$$\varepsilon_S(A) = A \ominus \check{S} = \{x \in I \mid S_x \subset A\}$$

Les effets attendus sur l'image seront : les objets de taille inférieure à celle de l'élément structurant vont disparaître; les autres objets seront érodés d'une partie correspondant à une fraction de la taille de l'élément structurant; s'il existe des trous dans les objets, c'est à dire des éléments de fond à l'intérieur des objets, ils seront agrandis; les objets reliés entre eux par des ponts d'une taille inférieure à S seront séparés.

L'érosion en traitement d'image permet entre autres de faire disparaître les petits artefacts.

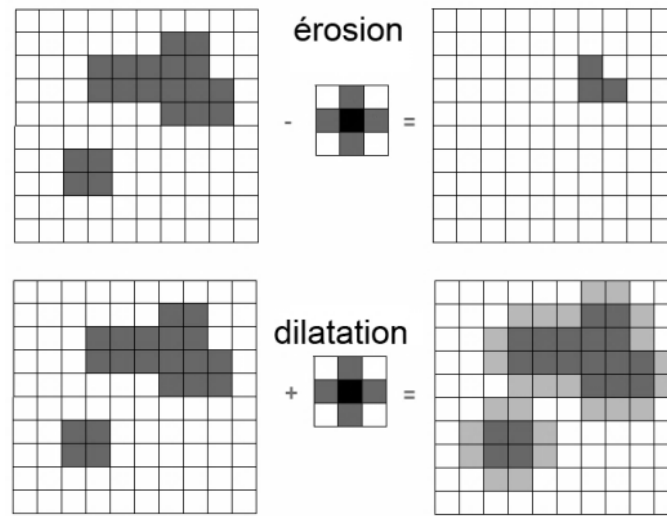


FIGURE 23 EFFET DE L'ÉROSION ET DE LA DILATATION PAR UN ÉLÉMENT STRUCTURANT

AVEC EN NOIR SON PIXEL D'ORIGINE (0,0).

iii. L'ouverture

La composition d'une dilatation morphologique avec l'érosion par le même élément structurant ne produit pas, en général, l'identité, mais deux autres opérateurs morphologiques, l'ouverture et la fermeture morphologique selon l'ordre de la composition.

L'ouverture consiste donc en une érosion suivie d'une dilatation, voir la Figure 24.

$$\gamma_S(A) = \delta_S(\varepsilon_S(A)) = (A \ominus \check{S}) \oplus \check{S}.$$

Les principaux effets attendus sur l'image sont : la suppression des petits artefacts et la disparition des liens étroits entre deux zones compactes.

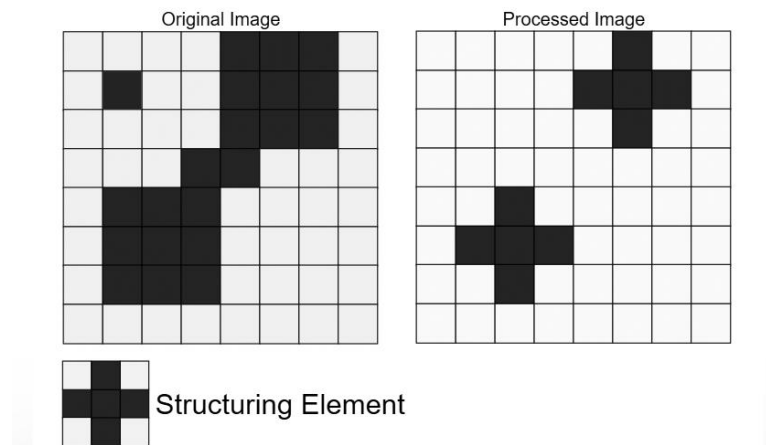


FIGURE 24 RESULTAT D'UNE OUVERTURE.

iv. La fermeture

La fermeture est le pendant de l'ouverture. Les opérations se font dans l'ordre inverse : une dilatation suivie d'une érosion, voir Figure 25.

$$\phi_S(A) = \varepsilon_S(\delta_S(A)) = (A \oplus \check{S}) \ominus \check{S}.$$

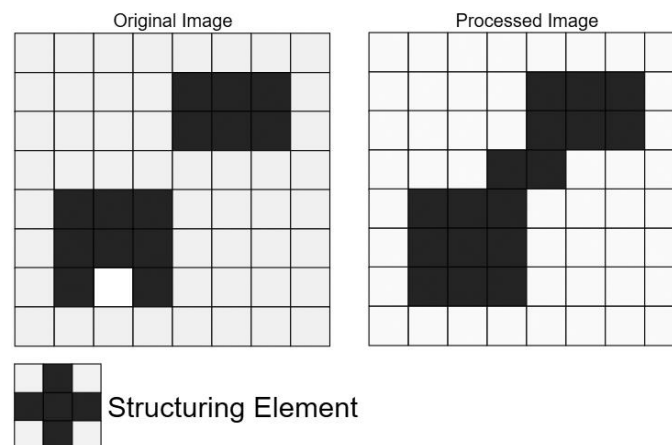


FIGURE 25 RESULTAT D'UNE FERMETURE

Les principaux effets attendus sur l'image sont : la suppression des petits trous et la fusion des zones compactes peu éloignées.

v. La squelettisation

La squelettisation (Calabi et Hartnett 1968) est une étape essentielle de la reconnaissance de forme. Elle a pour but de décrire chaque objet par un ensemble de lignes « infiniment » fines dans \mathbb{Z}^2 (1 pixel de large) et correspondant au squelette de l'objet, réduisant ainsi sensiblement le volume d'information à manipuler. Le squelette a plusieurs définitions qui donnent des résultats à peu près équivalents. Il est généralement défini comme étant l'ensemble des lignes médianes de A , c'est-à-dire

l'ensemble des points équidistants de deux points de la frontière. La frontière de A est l'ensemble des points de A ayant au moins un voisin (notion de connectivité 4 ou 8) non élément de A , voir la Figure 26.

Le squelette peut être calculé par la méthode dite des boules maximales : la boule maximale autour d'un point a de A est le plus grand cercle centré en a inclus dans A . Le squelette de A est alors le lieu des centres des boules maximales intérieurement tangentes à la surface de A . On parle de boules, car la méthode peut être extrapolée dans la troisième dimension, mais dans le cas des images binaires, nous utilisons des cercles.

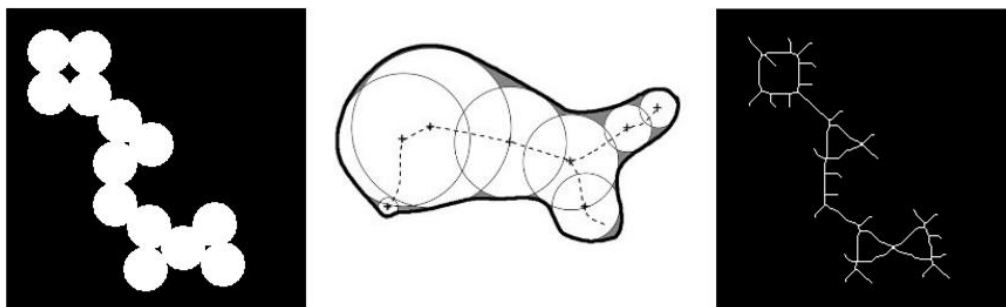


FIGURE 26 PRINCIPE DE LA SQUELETTISATION. À GAUCHE IMAGE BINAIRE, AU CENTRE, ILLUSTRATION DE L'ALGORITHME DE LA BOULE MAXIMALE, A DROITE LE SQUELETTE CORRESPONDANT A L'IMAGE BINAIRE DE GAUCHE.

vi. Le « *Hole filling* »

Le « *hole filling* » est une étape souvent primordiale dans le traitement d'image. Il permet comme son nom l'indique de remplir les trous dans les objets de l'image. Il peut servir à éliminer des trous de différentes formes ou tailles en fonction de l'élément structurant utilisé, voir la Figure 27. Mathématiquement, il peut se décrire comme la suite d'opérations suivantes (Pierre Soille 2013) :

$$X^k = (X^{k-1} \oplus S) \cap A^c, \text{ pour } k = 1, 2, 3, \dots, k-1$$

Avec S l'élément structurant, A l'objet contenant le trou à boucher, A^c le complémentaire de A et X^0 le point de départ du remplissage sélectionné à l'intérieur du contour de A .

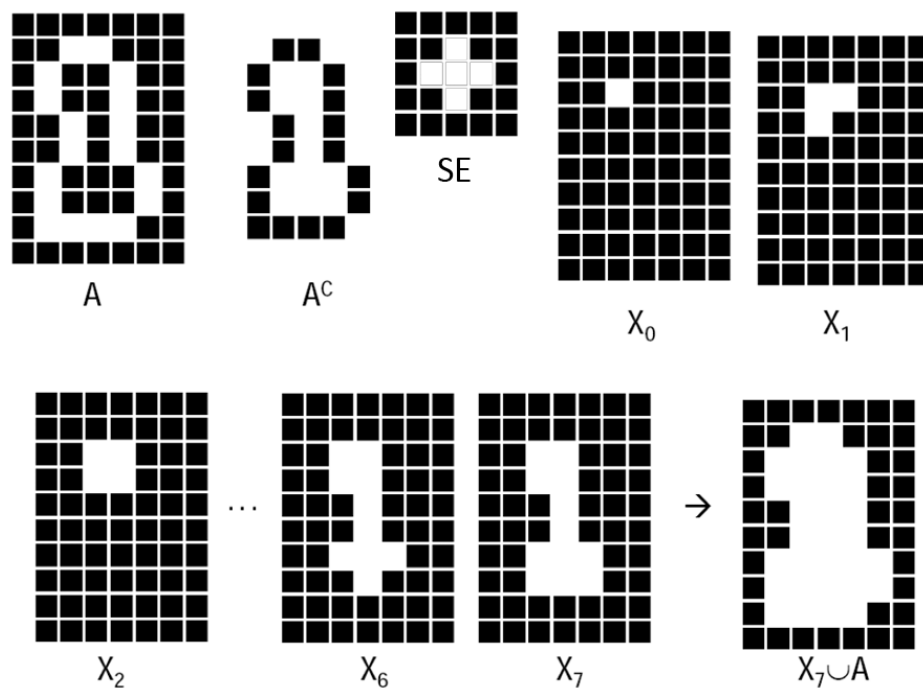


FIGURE 27 LES DIFFERENTES ETAPES DE L'ALGORITHME DE "HOLE FILLING" MORPHOLOGIQUE.

La Figure 27 présente l'application de l'algorithme sur le cas concret d'une segmentation de pièces de monnaie.

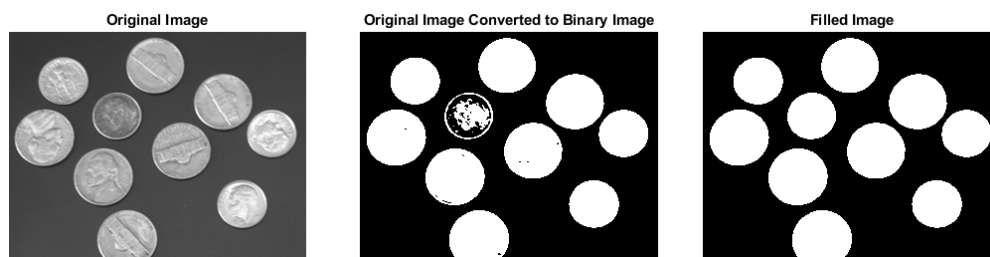


FIGURE 28 EXEMPLE DE "HOLE FILLING" SUR L'IMAGE BINARISEE DE PIECES DE MONNAIE (D'APRES MATLAB ©)

3. La transformée de Hough linéaire

La détection de motifs géométriques simples comme des droites ou des cercles dans une image numérique sont des tâches qui semblent simples. Cependant, les caractérisations géométriques d'objets mathématiques simples tels que ceux-ci est rendu difficile par la discrétisation de l'espace image : en effet, une droite dans une image numérique apparaît comme une suite de pixels « allumés » voir Figure 29. Déterminer si une suite de pixels peut être assimilée ou non à un segment de droite est difficile a priori, car une suite de pixels n'est jamais réellement alignée au sens mathématique du terme, sauf dans les cas triviaux : horizontale, verticale ou diagonale à 45° .

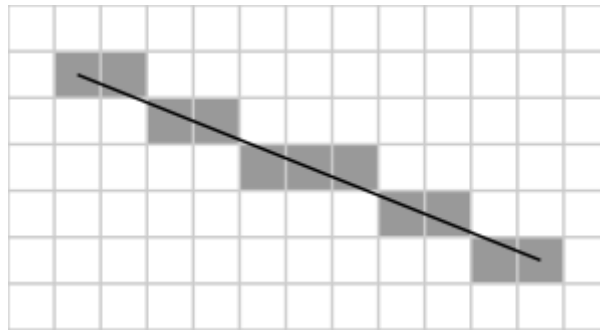


FIGURE 29 DISCRETISATION D'UNE LIGNE DROITE DANS UNE MATRICE DE PIXELS.

Pour résoudre ce problème, Paul Hough a proposé en 1962 une méthode élégante qui porte aujourd'hui son nom (Hough 1962). La transformée de Hough a été introduite dans un brevet sous sa forme la plus élémentaire. Son champ d'application initial visait, en physique des particules, la détection des lignes et des arcs dans les photographies obtenues dans les chambres à bulles, voir Figure 30.

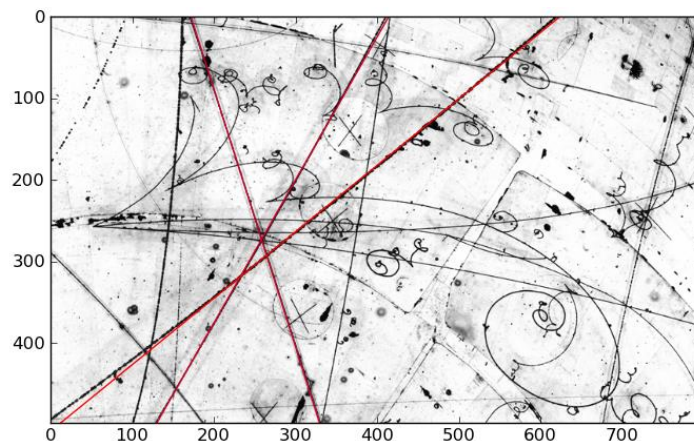


FIGURE 30 TRACES DE PARTICULES ELEMENTAIRES DANS UNE CHAMBRE A BULLES ET SURIMPRESSION DE LIGNES(EN ROUGE)
IDENTIFIEES PAR TRANSFORMEE DE HOUGH

Elle fut ensuite perfectionnée en 1972 par Duda et Hart (Duda et Hart 1972) qui introduisirent l'utilisation des coordonnées polaires pour la représentation des droites. Cette modification apporte beaucoup plus de souplesse et de meilleures performances. Ce faisant, elle est devenue un outil efficace de détection de lignes. De nombreuses adaptations et perfectionnements de cette méthode ont été étudiés depuis, mais l'esprit reste le même. L'idée forte de cette méthode est simple: substituer un problème complexe de reconnaissance de forme à un problème plus simple de recherche des maxima dans une matrice.

Nous utiliserons cette technique à différentes reprises dans le chapitre « La détection et la caractérisation de la grille » page 91.

a. Principe de fonctionnement.

Nous devons faire l'hypothèse (raisonnable) suivante : si des lignes ou des segments de droites sont présents dans une image, alors ils font partie des contours présents dans l'image. Nous commençons donc dans un premier temps par identifier tous les points des contours de cette image. Les points de l'image présentant les gradients les plus élevés dans leur voisinage, soit globalement pour l'image (seuillage fixe), soit par rapport aux gradients généralement présents dans un voisinage plus large autour du point (seuillage dynamique), sont les plus susceptibles d'appartenir aux contours de cette image. Classiquement, cela est accompli à l'aide de techniques de mesure de gradients locaux tels que Sobel (Gupta 2013) ou Canny (Canny 1986).

Pour chacun des points de contours ainsi identifiés, les équations en coordonnées polaires des droites passant par chacun de ces points (x, y) sont déterminées par l'Équation 3

ÉQUATION 3 EQUATION CARTESIEENNE D'UNE DROITE EN COORDONNEES POLAIRES

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

Où θ est l'angle de la droite avec l'axe des ordonnées et ρ la distance de la droite à l'origine, voir Figure 31.

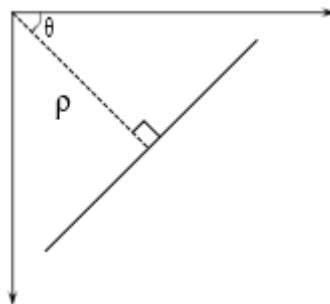


FIGURE 31 REPRESENTATION EN COORDONNEES POLAIRES D'UNE DROITE DANS LE REPERE (θ, ρ)

Nous pouvons remarquer ici que la représentation en coordonnées polaires introduite par Duda et Hart (Duda et Hart 1972) est préférable à la représentation cartésienne $y = ax + b$ initialement utilisée par Hough. Cette dernière pose problème pour les droites horizontales et verticales, la configuration verticale représentant même une réelle singularité pour la méthode de Hough, car la pente est alors infinie.

Cela va alors permettre une représentation dans un plan (le plan (θ, ρ) que nous nommerons **l'espace des paramètres ou encore espace de Hough**) des coordonnées polaires de toutes les droites passant par le point (x, y) . À chaque point du contour, nous faisons donc correspondre une sinusoïde telle que :

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

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

Le plan (θ, ρ) , limité aux intervalles de recherche voulue, est alors subdivisé en cellules par quantification des paramètres θ et ρ avec les pas respectifs $\Delta\theta$ et $\Delta\rho$ (indexation par les indices p et q). La Figure 32 ci-dessous montre un exemple de quadrillage du plan (θ, ρ) . Un tableau $A(p, q)$, dont les valeurs sont initialement mises à zéro, est associé à ce quadrillage. Ce tableau est appelé **l'accumulateur ou espace de vote**.

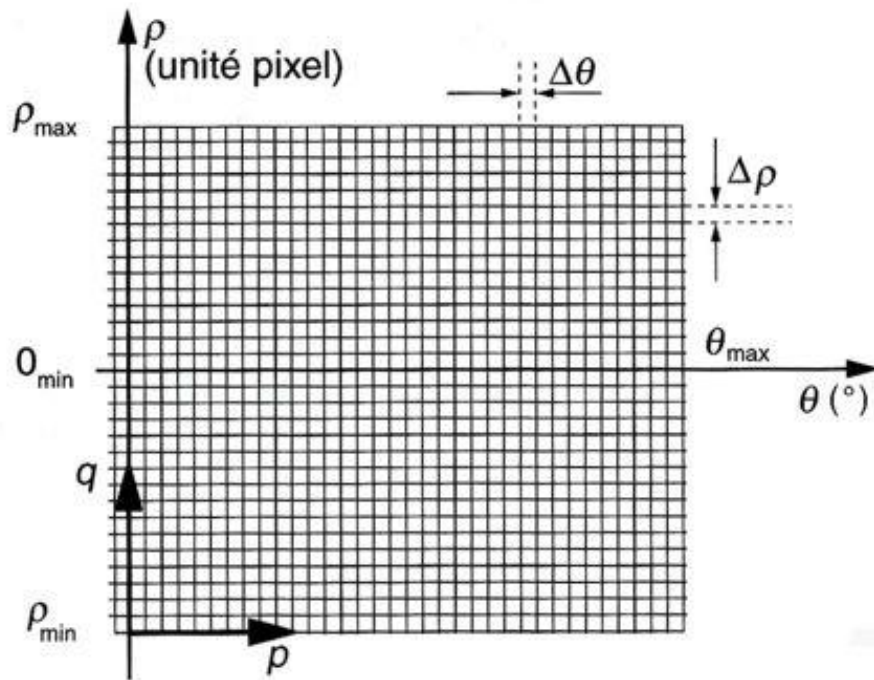


FIGURE 32 DISCRETISATION DE L'ESPACE DES PARAMETRES

L'idée principale de la méthode de Hough est que toutes les sinusôides issues de points alignés vont se croiser en point unique dans l'espace des paramètres. Les coordonnées de ce point dans l'espace des paramètres donnent des valeurs de θ, ρ , solutions de l'équation de la droite qui porte ces points, voir la Figure 33.

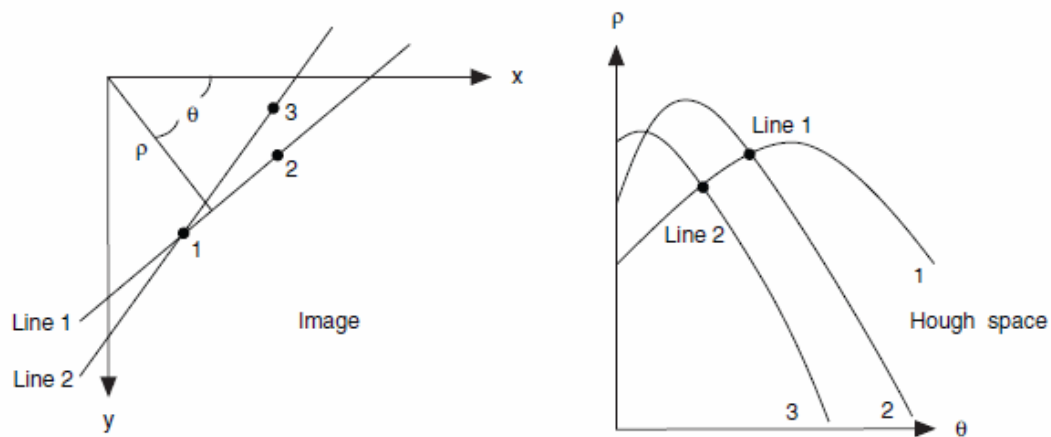


FIGURE 33 A TRANSPOSITION DANS L'ESPACE DES PARAMETRES. DROITE: ESPACE IMAGE, 2 DROITES LINE1 ET LINE2 PORTENT 3 POINTS. À GAUCHE, L'ESPACE DES PARAMETRES OU "HOUGH SPACE" LES 3 SINUSOÏDES ISSUES DES 3 POINTS

Une fois appliqués cette idée à tous les points des contours, et, pour chacun, à tous les angles θ possibles, les points (θ, ρ) de l'espace des paramètres les plus souvent adressés donnent alors les coordonnées des droites ou des segments de droite les plus statistiquement probables dans l'image de départ. L'algorithme traduit en pseudo-code s'écrit de la façon suivante :

Algorithme : La transformée de Hough linéaire classique.

Requis: I {Binary image}

Requis: s {Discretization step for the parameter space}

1: $Votes \leftarrow 0$ {Initialization of the voting matrix}

2: **for** each contour pixel $I(x, y)$ **do**

3: **for** $0^\circ \leq \theta < 180^\circ$, using a s discretization step **do**

4: $\rho \leftarrow x \cos(\theta) + y \sin(\theta)$

5: $Votes(\rho, \theta) \leftarrow Votes(\rho, \theta) + 1$

6: **end for**

7: **end for**

En pratique, l'espace des paramètres de Hough sera représenté par une image, dont les abscisses seront les angles θ , et les ordonnées seront les valeurs de ρ , et dont l'intensité au point quelconque (θ, ρ) est le nombre d'occurrences de (θ, ρ) provenant de l'image d'origine. Les valeurs de θ peuvent être discrétisées par exemple en degrés selon la précision souhaitée, et les valeurs de ρ en pixels représentant la distance (toujours inférieure ou égale en valeur absolue à la diagonale de l'image de départ, car cela représentera la plus grande valeur de ρ possible). Les Figure 34, Figure 35 et Figure 36 présentent différents exemples de distributions de points et l'espace de Hough correspondant. Pour la Figure 33, les points étant distribués aléatoirement, l'espace de Hough ne montre rien de remarquable. Dans le cas de la Figure 36, il devient assez simple d'identifier le point singulier qui indique la présence d'un alignement de points dans l'espace image (une droite !):

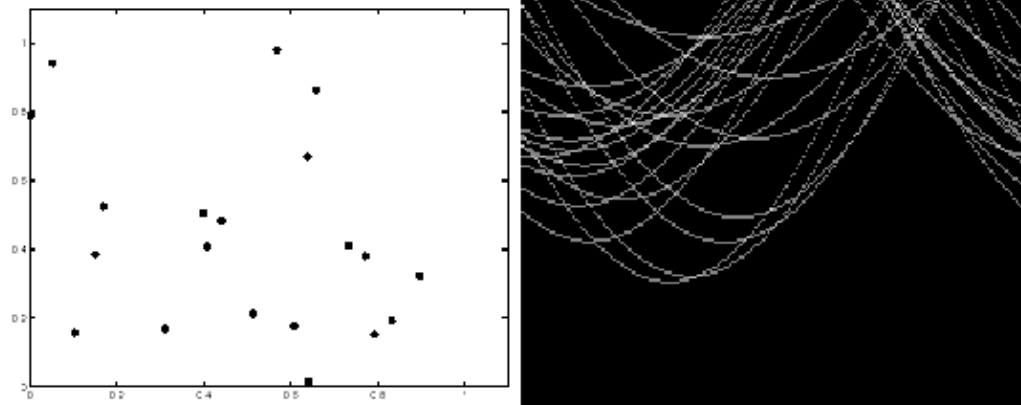


FIGURE 34 TRANSFORMEE DE HOUGH DE POINTS ALEATOIRES. À GAUCHE, ESPACE IMAGE, A DROITE, L'ESPACE DES PARAMETRES AVEC LES SINUSOÏDES CORRESPONDANTES.

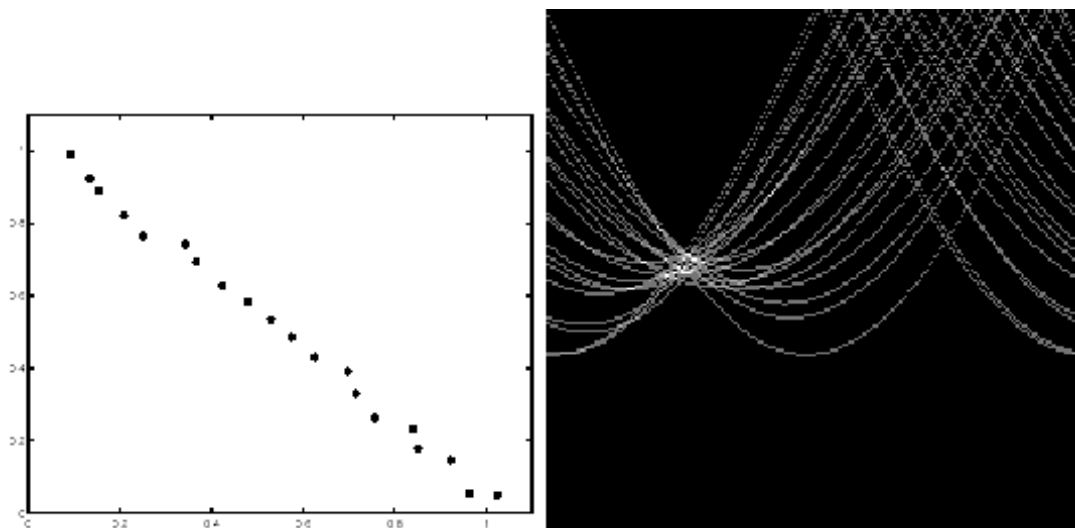


FIGURE 35 TRANSFORMATION DE HOUGH AVEC DES POINTS GROSSIEREMENT ALIGNES. À GAUCHE, ESPACE IMAGE, A DROITE, L'ESPACE DES PARAMETRES CORRESPONDANT

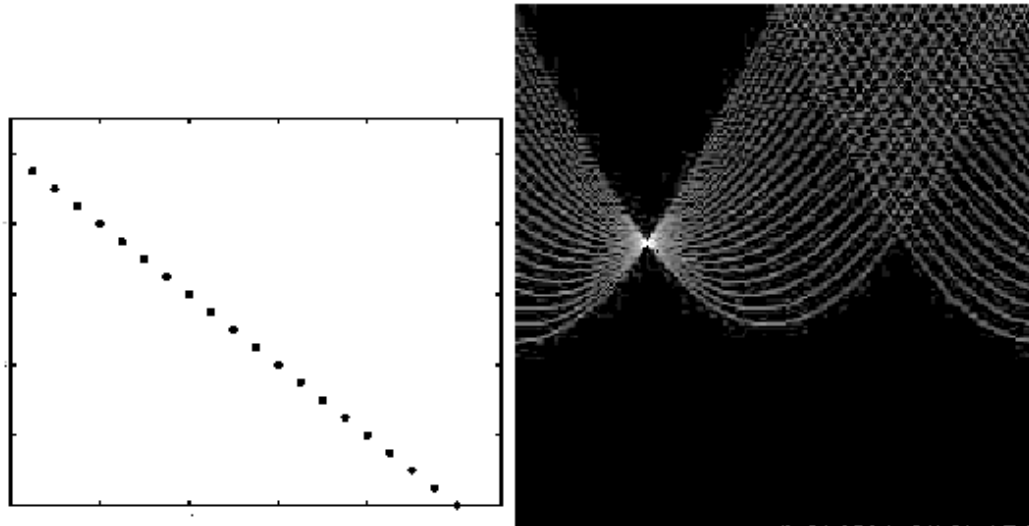


FIGURE 36 TRANSFORMATION DE HOUGH AVEC DES POINTS PARFAITEMENT ALIGNÉS. À GAUCHE, ESPACE IMAGE, A DROITE, L'ESPACE DES PARAMETRES CORRESPONDANT

La transformée de Hough linéaire utilise essentiellement l'information spatiale (leur position dans l'image) de points caractéristiques (contours), mais certaines variantes tiennent compte également de l'information contenue dans le signal d'image lui-même, comme la valeur de la luminance en un point donné pour pondérer l'incrément dans l'espace de Hough.

Toutefois, concernant la continuité des droites ou des segments de droite de l'image de départ, aucune hypothèse n'est faite ici. Cela rend la transformée robuste aux perturbations telles que l'occlusion des objets ou des pixels, les données manquantes, les parasites dus au bruit provenant soit de l'imperfection des données d'image, soit de la défaillance de la détection de contours.

La méthode permet également de distinguer des droites portant des alignements approximatifs, voir Figure 35. Toutes ces perturbations ne modifient que marginalement (d'un point de vue statistique) le nombre de votes et donc ne perturbent pas outre mesure l'accumulation dans l'espace des paramètres. C'est la robustesse de ce concept d'accumulation qui est à l'origine de la popularité et des performances de la transformée de Hough et des nombreuses méthodes dérivées.

b. Application à une image réelle.

Examinons à présent ce que donne cette méthode sur une image « réelle ». La Figure 37 représente une photographie numérique couleur. Nous pouvons déceler aisément à l'œil des alignements. La Figure 38 est le résultat du filtrage de la photographie de l'immeuble de la Figure 37 par un filtre de Canny (Canny 1986), pour mettre en évidence les contours, combiné au tracé des lignes découvertes par la transformée de Hough.



FIGURE 37 PHOTO D'UN IMMEUBLE (EXEMPLE TIRE DE LA DOCUMENTATION D'OPENCv¹³)

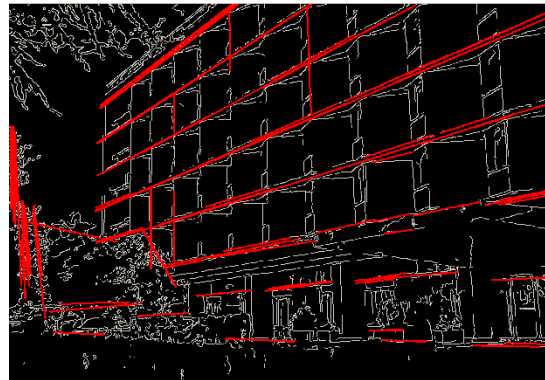


FIGURE 38 IMAGE PRESENTANT LES CONTOURS (EN BLANC) DE L'IMAGE ORIGINALE ET LES DROITES DETECTEES GRACE A LA TRANSFORMEE DE HOUGH LINEAIRE (EN ROUGE)

Il est intéressant de remarquer dans ce résultat que toutes les lignes perçues par notre cerveau ne sont pas représentées. Cela peut être dû à de nombreux facteurs. En premier, les réglages et les choix de discrétisations de l'espace des paramètres influent beaucoup sur le résultat final de la méthode.

¹³ http://docs.opencv.org/2.4/modules/imgproc/doc/feature_detection.html?highlight=houghlines

4. La transformée de Hough circulaire

a. Remarque liminaire

La transformation de Hough linéaire met en évidence la dualité de lecture de l'équation d'une droite :

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

Si ρ et θ sont les paramètres fixés, nous avons alors l'équation d'une droite.

$$f_{\rho,\theta}(x,y) = 0.$$

Mais si nous considérons x et y comme les paramètres alors nous obtenons l'équation d'une sinusoïde

$$g_{x,y}(\rho, \theta) = 0.$$

Cette dualité est susceptible d'être appliquée de façon générale à la recherche dans une image de toutes les courbes décrites par une équation cartésienne. Néanmoins, le cas de la droite est particulièrement simple, car la droite et sa sinusoïde duale sont représentées chacune par 2 paramètres.

b. Définition

La transformation de Hough (TH) peut également être utilisée pour trouver des cercles dans une image. Les premiers à décrire l'emploi de la TH pour détecter des cercles dans des images réelles sont Kimme, Ballard, et Sklansky (Kimme, Ballard, et Sklansky 1975). Comme la droite, le cercle de rayon r et centre (a, b) , peut être décrit par une équation cartésienne :

ÉQUATION 4 EQUATION CARTESIENNE D'UN CERCLE

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

L'ensemble des points (x, y) se situe sur le périmètre du cercle de centre (a, b) et de rayon r . Il s'agit donc cette fois de déterminer les paramètres d'un cercle à l'aide d'une transposition dans un espace à trois dimensions. Pour un point (x, y) quelconque dans l'image, alors l'Équation 4 permet de calculer le triplet de paramètres (a, b, r) pour décrire ce cercle. Par rapport au cas de la droite, il y a donc un paramètre supplémentaire r à déterminer.

c. La méthode dans le cas où r est fixé.

Si r est fixé, l'espace des paramètres se réduit à deux dimensions (la position (a, b) du centre du cercle). Pour chaque point $P(x, y)$ d'un contour de l'espace image, nous pouvons donc, selon l'Équation 4, définir dans l'espace des paramètres un cercle centré sur (x, y) et de rayon r sur le périmètre duquel se trouvent tous les centres possibles de tous les cercles de rayon r passant par P .

Si un second point $P'(x, y)$ figure sur le même cercle dans l'espace image, alors leurs cercles dans l'espace dual s'intersecteront.

Une matrice d'accumulation est utilisée pour suivre ces points d'intersection. Dans l'espace des paramètres, chaque cercle augmente d'un vote les cases de l'accumulateur correspondantes à sa circonférence discrétisée (Bresenham 1965). Dans l'exemple Figure 39, le point vert au centre affiche 3 votes. Le processus d'accumulation est donc le même que pour la transformée de Hough linéaire, la courbe duale étant ici un cercle.

Les coordonnées (a, b) du maximum local peuvent ensuite être retrouvées. Elles devront alors être considérées comme une estimation de celles du centre du cercle d'origine.

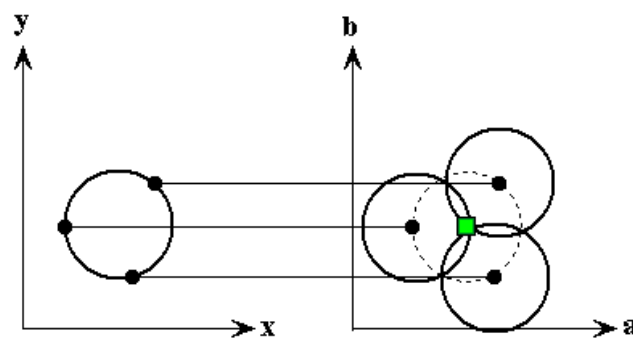


FIGURE 39 PRINCIPE DE LA TRANSFORMEE DE HOUGH CIRCULAIRE. CHAQUE POINT DE L'ESPACE IMAGE (GAUCHE) GENERE UN CERCLE DANS L'ESPACE DES PARAMETRES (A DROITE). LES CERCLES DANS L'ESPACE DES PARAMETRES SE CROISENT EN UN POINT QUI EST LE CENTRE ESTIME DU CERCLE DANS L'ESPACE IMAGE (CARRE VERT).

L'algorithme de la transformée de Hough circulaire peut s'écrire comme suit:

Requis *edges (Canny, Sobel, etc), r (radius)*

1. *accumulator* $\leftarrow 0$ {Initialization of the voting matrix}
2. For each point in *edges*
- 3 Draw a circle with center in the edge point with radius *r*
- 4 increment all coordinates that the perimeter of the circle passes through in the accumulator.
- 5 end For
- 6 Find one or several maxima in the accumulator
7. Map the found parameters (r, a, b) corresponding to the maxima back to the original image

d. Cas de cercles multiples de rayon r

De multiples cercles de rayon r fixé peuvent être trouvés avec la même technique. Dans le cas où les cercles sont suffisamment distants les uns des autres pour ne pas s'intersecter, il n'y a pas de difficulté. Dans le cas d'images présentant de nombreux cercles voisins, l'interprétation de l'espace des paramètres devient rapidement très délicate, car il apparaît des maxima locaux à l'intersection de cercles voisins (carré rouge de la Figure 40).

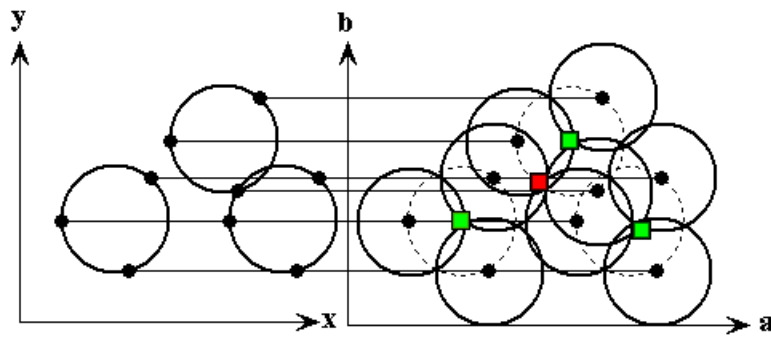


FIGURE 40 TRANSFORMÉE DE HOUGH CAS DE CERCLES MULTIPLES DE MEME RAYON.

Selon la sensibilité du seuil avec lequel nous sélectionnons les pics dans l'accumulateur, l'interprétation de ces maxima peut conduire à la détection de faux cercles. Cela constituera un autre point de vigilance lors de nos travaux.

e. Application sur une image réelle

Nous appliquons la détection de cercle par la méthode de la transformée de Hough circulaire sur une image réelle Figure 41. Les contours de l'image sont extraits par la méthode de Canny. Un seuillage haut et bas est appliqué à la sortie du filtre de Canny de manière à éliminer les contours non désirés (Figure 42). Les Figure 43 et Figure 44 montrent les matrices d'accumulation en fonction du rayon choisi et les Figure 45 et Figure 46 montrent en surimpression sur l'image originale le cercle détecté.



FIGURE 41 IMAGE ORIGINALE (EXEMPLE TIRE DU COURS DE SUJIN PHILIP DE L'UNIVERSITY OF UTAH)

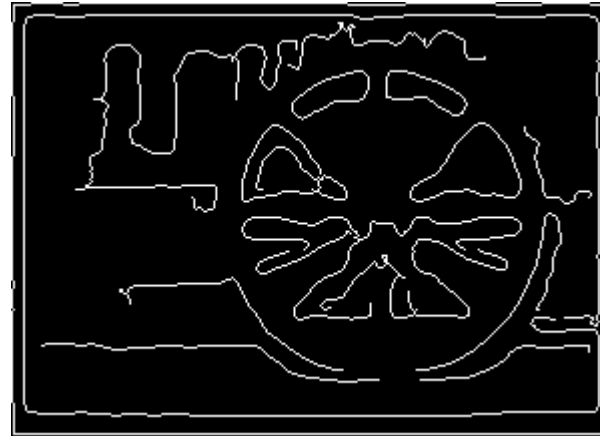


FIGURE 42 CONTOURS PRINCIPAUX DE L'IMAGE ORIGINALE OBTENUE PAR FILTRE DE CANNY : SEUIL HAUT = 15, SEUIL BAS = 5.

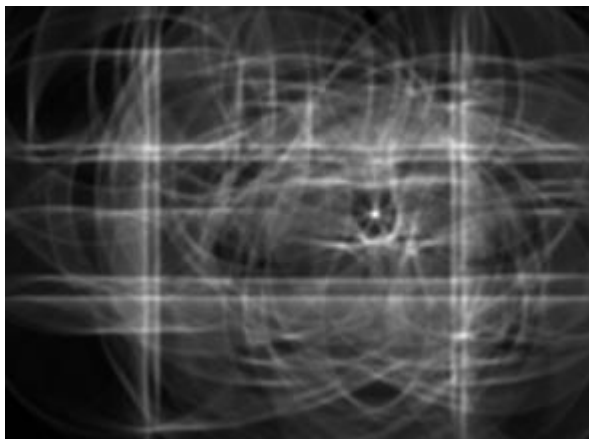


FIGURE 43 MATRICE D'ACCUMULATEUR POUR RAYON=82 PIXELS

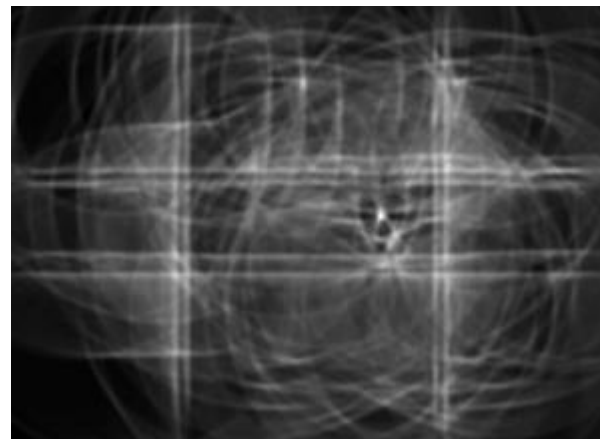


FIGURE 44 MATRICE D'ACCUMULATEUR POUR RAYON=72 PIXELS

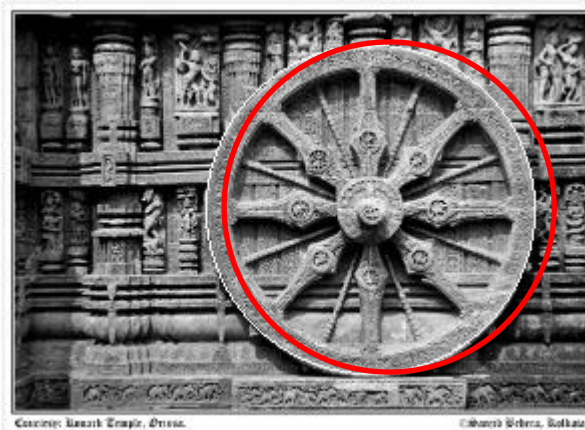


FIGURE 45 CERCLE EXTERIEUR DETECTE

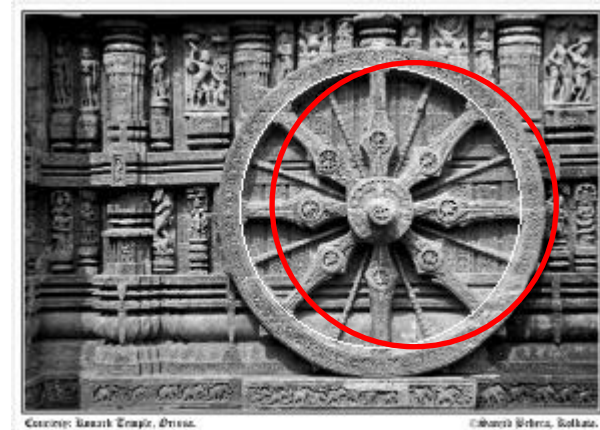


FIGURE 46 CERCLE INTERIEUR DETECTE

Ici encore la méthode de Hough démontre ses possibilités. Cependant, nous pouvons objecter que la qualité du résultat dépendra du choix judicieux des valeurs retenues pour le rayon r ou pour celui des

valeurs de seuillage du filtre de Canny. S'affranchir de ces choix arbitraires constituera un point de progrès essentiel pour nos applications.

f. Cas où r est variable.

Si r est variable, alors tous les paramètres (a, b, r) qui satisfont l'Équation 4 ne se situent non plus sur un cercle, mais à la surface d'un $\frac{1}{2}$ cône dont l'apex est à $(x, y, 0)$ Figure 47. L'espace des paramètres devient alors tridimensionnel. Dans cet espace 3D, les paramètres du cercle peuvent être identifiés par l'intersection de nombreuses surfaces coniques définies par les points du cercle de l'espace image.

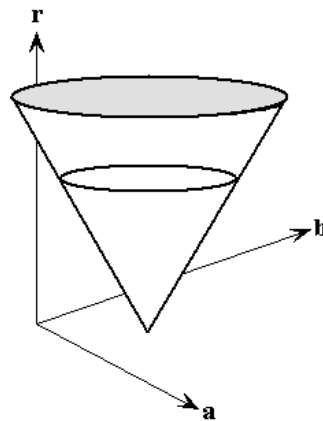


FIGURE 47 LA GÉNÉRATION D'UNE SURFACE CONIQUE DANS L'ESPACE DES PARAMÈTRES POUR UN POINT (a, b) . UN CERCLE AVEC UN RAYON DIFFÉRENT SERA CONSTRUIT À CHAQUE VALEUR DE r .

Le fait que l'espace des paramètres soit de dimension trois rend la mise en œuvre directe de la technique Hough coûteuse en mémoire et en temps de calcul.

Pour simplifier un peu la mise en œuvre, le processus peut être divisé en deux étapes :

- La première étape consiste à fixer le rayon puis à trouver le centre optimal des cercles de ce rayon dans un espace de paramètres 2D.
- La seconde étape consiste à réaliser une itération sur le rayon et à répéter l'étape 1 en réalisant une projection dans une matrice 2D des maxima correspondant à chaque accumulateur, voir la Figure 48.

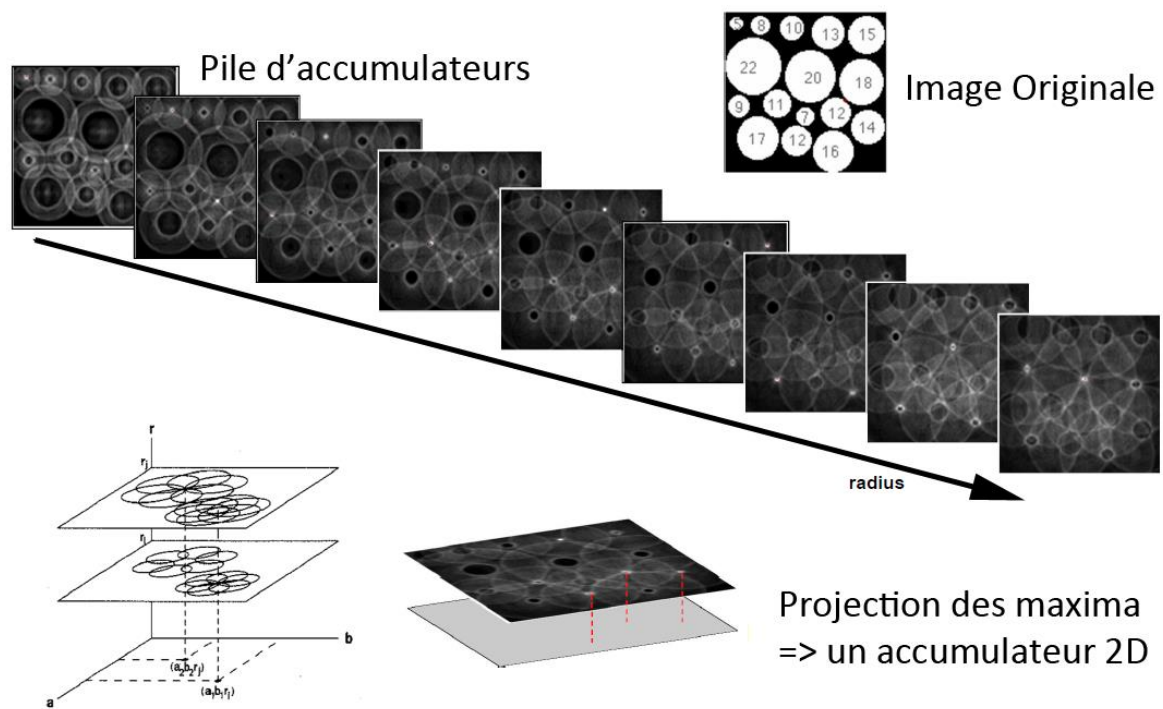


FIGURE 48 TRANSFORMEE DE HOUGH POUR LE CAS DES CERCLES DE RAYON VARIABLE

Bien que cette technique soit applicable à toute équation paramétrique, la complexité de calcul s'accroît directement avec le nombre de paramètres de l'équation.

L'exemple de l'ellipse est caractéristique : une ellipse est déterminée par son centre (2 paramètres), ses deux demi-axes (2 paramètres) et son orientation (1 paramètre) soit 5 paramètres. L'espace de vote est donc de dimension 5, cela rend techniquement l'exploitation du tableau d'accumulation impraticable.

De nombreux chercheurs ont proposé des solutions à ce problème, voir par exemple les travaux de Mukhopadhyay et Chaudhuri (Mukhopadhyay et Chaudhuri 2015) en tentant notamment de réduire la taille de l'espace des paramètres par le biais de l'introduction d'autres informations. En effet, réduire les écritures dans la matrice d'accumulation améliore la précision et la vitesse de la méthode.

D'un point issu d'un fragment de contour, nous pouvons extraire essentiellement deux informations : la direction du contour et sa forme. Cela se traduit mathématiquement par la tangente (ou la normale) et la courbure.

Il est possible par exemple d'exploiter l'information supplémentaire portée par le gradient des contours. Dans le cas du cercle, la normale au contour pointe vers le centre.

Pour un cercle de rayon connu, au lieu de tracer le cercle dual complet Kimme, Ballard, et Sklansky (Kimme, Ballard, et Sklansky 1975) proposent de ne tracer qu'un arc de cercle, englobant la position

du centre supposé, Figure 49. L'ouverture de l'arc est fixée arbitrairement à 45° , soit un huitième de cercle, de manière à tenir compte de l'imprécision du calcul de la normale.

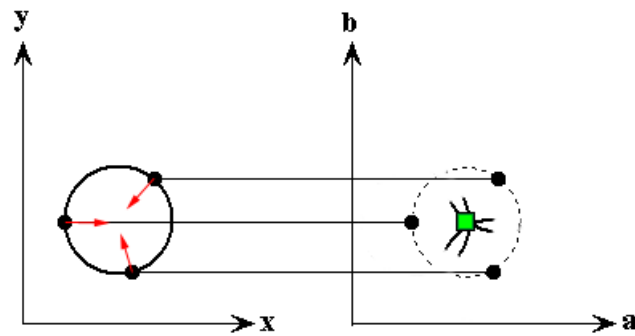


FIGURE 49 EXPLOITATION DE LA DIRECTION DU GRADIENT DES CONTOURS POUR REDUIRE LE NOMBRE DE VOTES DANS LA MATRICE D'ACCUMULATION

Cette méthode permet d'obtenir une matrice d'accumulation contenant beaucoup moins de parasites. Les pics sont donc beaucoup plus marqués grâce à un rapport signal sur bruit plus élevé. Cela permet également d'accélérer l'algorithme en réduisant de 75% le nombre de cases adressées dans la matrice d'accumulation. Cependant, dans le cas d'un cercle de rayon inconnu, la complexité de cette méthode classique optimisée reste en $O(m.n.r)$.

L'idée de l'exploitation de l'information portée par la normale peut être poussée plus loin, c'est ce qui est proposé dans la méthode décrite dans le chapitre suivant.

5. La transformée de Hough par gradient

Davies a introduit, en modifiant le schéma de la transformée de Hough circulaire, une technique pour réduire la complexité de la méthode en $O(m.n)$ (Davies 1988). Il propose alors d'exploiter l'information de gradient de façon différente et il introduit ainsi la transformée de Hough par gradient (Gradient Accumulation Transform, GAT).

Comment ? D'abord en faisant la remarque un peu triviale que le centre d'un cercle est le point d'intersection de toutes les normales au bord du cercle, voir la Figure 50. Ensuite, en faisant l'hypothèse que l'erreur sur l'orientation du gradient est négligeable.

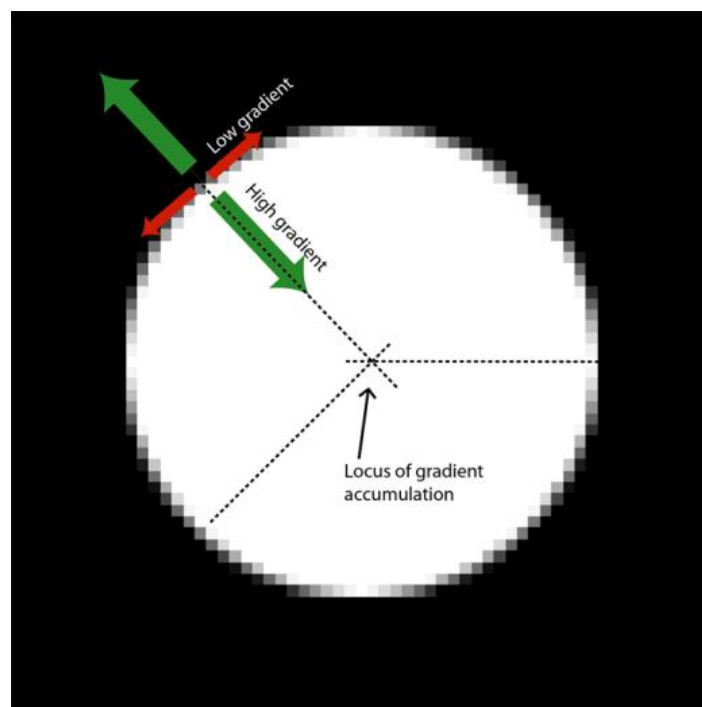


FIGURE 50 PRINCIPE DE LA TRANSFORMÉE DE HOUGH PAR ACCUMULATION DE GRADIENT: LES VECTEURS DE GRADIENTS CONVERGENT VERS LE CENTRE DU CERCLE.

De fait, nous devrions pouvoir ne tracer qu'un simple point figurant le centre supposé du cercle. Nous savons pertinemment que cela n'est pas tout à fait juste, mais l'erreur commise sur chaque normale peut être considérée comme aléatoire et statistiquement, l'accumulation des votes autour de la position du centre recherché devrait quand même être suffisamment significative pour former un pic. Cette remarque et cette hypothèse simplificatrice vont permettre à Davies de réduire la dimension de l'espace des paramètres à 2 dimensions pour un cercle de rayon r inconnu.

Pratiquement, au lieu de tracer un cercle ou bien un arc de cercle sur plusieurs plans d'accumulation en fonction de r , nous allons tracer une droite issue du point de contour considéré, portée par la direction du gradient, puis incrémenter les cases de la matrice d'accumulation le long de cette droite. L'espace des paramètres passe du cône à deux lignes seulement, voir la Figure 51.

Chaque point de cette droite, discrétisée, portera un vote pour un rayon r possible. Si un grand nombre de points de contour font partie de la circonférence d'un cercle de rayon R , alors le point de la matrice d'accumulation à la distance égale à R et dans la direction du gradient sera porteur de nombreux votes. En pratique, cette droite n'est pas infinie, c'est un segment borné par la plage des rayons recherchés définis par $[rmin, rmax]$. Ce segment peut également être tiré dans le sens opposé du gradient, cela permet de chercher à la fois des cercles noirs sur fond blanc et des cercles blancs sur fond noir en une seule passe.

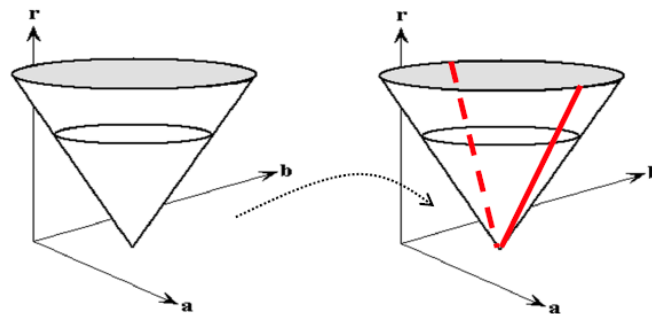


FIGURE 51 EXPLOITATION DIRECTE DE LA DIRECTION DU GRADIENT.

Compte tenu de l'erreur possible sur la direction du gradient, le pic sera formé par agrégation statistique autour des coordonnées réelles du centre du cercle. Cependant, Davies remarque que faire une recherche sur une grande plage de rayons fera baisser l'acuité de la détection. En effet, de nombreux votes parasites vont s'accumuler dans la matrice et faire baisser le rapport signal bruit. Ce sera également le cas si un grand nombre de cercles est présent ou si des cercles noirs et blancs sont recherchés simultanément. La détection de petits cercles mélangés à des cercles plus grands sera également rendue difficile pour les mêmes raisons. Les pics valides seront difficiles à distinguer des pics parasites. La détection des pics dans la matrice d'accumulation devient un point d'achoppement et cela constitue un point de progrès possible.

a. La détection des pics

Dans la méthode des gradients, la matrice d'accumulation contient un « bruit » inhérent aux nombreux votes issus des rayons explorés que la littérature propose de filtrer par différentes techniques telles que l'application d'un filtre gaussien (Figure 52), ou d'un filtre médian, voir par exemple les travaux de Kierkegaard (Kierkegaard 1992)

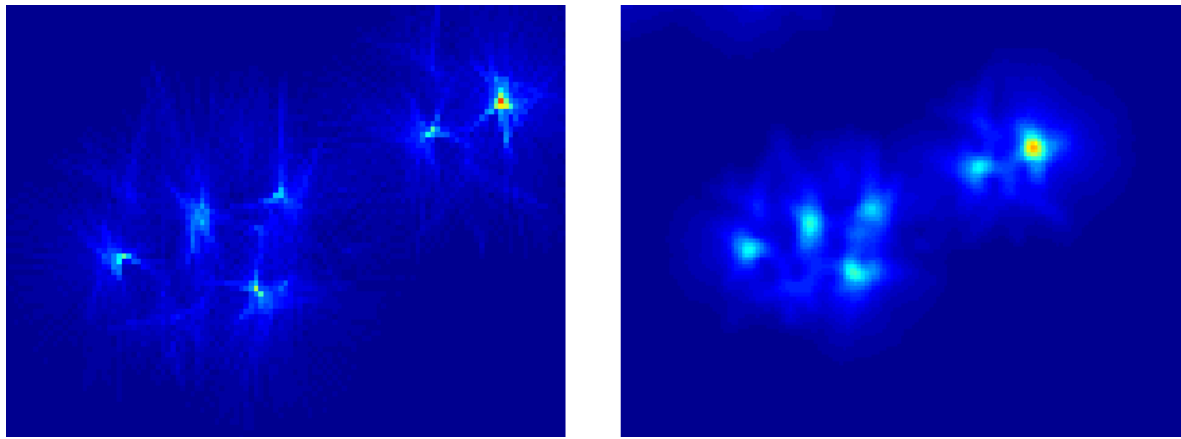


FIGURE 52 EXEMPLE DE FILTRAGE DE LA MATRICE D'ACCUMULATION PAR UN FILTRE GAUSSIEN

Ensuite, pour sélectionner les pics formés dans l'espace des paramètres en tant que centres, la méthode classique propose de prendre la valeur du plus grand pic comme référence et de rejeter tous les pics dont la valeur est inférieure à une fraction de cette référence.

Les propositions de Davies introduisent plus de souplesse et il estime (arbitrairement) que nous pouvons prendre comme valeur de seuillage 70% de la valeur du pic le plus fort. Les valeurs inférieures étant mises à zéro (Davies 1988). Cela n'est pas précisé dans son article, mais il va de soi que plus l'intervalle des rayons recherché $[rmin, rmax]$ sera grand, plus la valeur de ce seuillage relatif devra être faible pour tenir compte de l'écart d'intensité du pic généré par un cercle de petit rayon et celle d'un cercle de grand rayon.

L'écueil ici est que le choix d'une valeur de seuil trop basse risque de conduire à de nombreux faux positifs et le choix d'une valeur trop grande conduira à ne pas détecter les cercles les plus petits.

Par ailleurs, le calcul des rayons des cercles ainsi détectés est rendu délicat par la compression de l'espace des paramètres. En effet, l'information est perdue du fait de la superposition des différents niveaux codant le rayon. Davies propose alors une approche basée sur l'étude d'histogrammes radiaux permettant d'obtenir une estimation des rayons des cercles (Davies 1985). Cependant, il est à noter que ceci ne correspond pas à sa priorité applicative et, de fait, il n'étudie pas plus avant ce problème.

Malgré ces inconvénients, la souplesse ainsi obtenue et les gains en matière de performances de calcul et d'occupation mémoire sont déjà considérables. C'est à partir de cette méthode que nous avons travaillé. Cette technique de détection de cercle sera la base de nos travaux sur la détection des cellules de levures et leur comptage.

Dans cette thèse, nous proposons, dans le chapitre « La détection et le comptage des cellules » page 138, une variante et des modifications permettant d'esquiver certaines difficultés.

b. Détermination du rayon par calcul d'histogramme

Cette technique est introduite par Kierkegaard (Kierkegaard 1992). Il sélectionne les points de contour susceptibles d'appartenir au cercle dont le centre a été trouvé: il ne considère que les points de contour dont le gradient pointe approximativement ce centre (à 0.1 rad près) (Kierkegaard 1992). Il construit ainsi un histogramme qui, après passage à travers différents filtres en fonction de la taille du cercle, fournit le rayon recherché.

6. La transformée de Hough généralisée

La transformée Hough généralisée (GHT) est utilisée lorsque la forme que nous souhaitons détecter n'a pas d'équation analytique simple décrivant son contour, ou bien que l'équation analytique contient un trop grand nombre de paramètres. En effet, même dans les cas relativement simples tels que celui de l'ellipse, l'espace des paramètres atteint rapidement de grandes dimensions et rend prohibitifs les coûts d'implémentation tant en termes de mémoire que de calcul.

a. Principe

Dans ce cas, au lieu d'utiliser un espace de paramètres, nous préférons construire une table de recherche que nous appellerons une R-Table. Cette table associera, de façon éventuellement multivaluée, les coordonnées d'un ou plusieurs centres possibles aux propriétés locales des points de contours. Elle a été développée initialement par Ballard (Ballard 1987), et permet d'étendre aux formes quelconques le principe d'accumulation, base de la transformée de Hough.

b. Calcul de la R-Table

Ballard introduit une table d'affectation, la R-table, dont les valeurs sont calculées au cours d'une phase d'apprentissage à l'aide d'une forme modèle (Ballard 1987). Ce modèle est généralement une image "échantillon" de l'objet que l'on cherche et dont nous avons extrait les contours. La R-Table est une représentation codée de cette forme. Elle se construit comme suit :

Soit (x_c, y_c) le « centre » du modèle que l'on peut choisir de façon arbitraire. Soit \vec{X} le vecteur de référence fixant l'orientation de la forme que l'on peut choisir de façon arbitraire, mais souvent choisie comme étant l'axe horizontal. Soit \vec{G} le vecteur perpendiculaire à la tangente au contour en un point (X, Y) comme indiqué Figure 53.

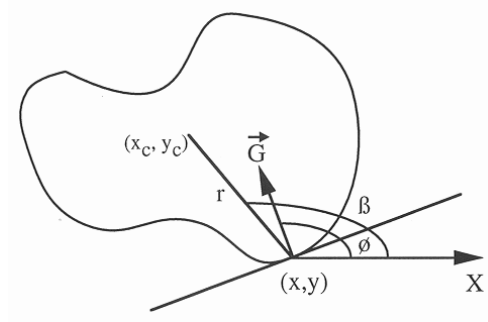


FIGURE 53 CODAGE D'UNE FORME QUELCONQUE POUR LA TRANSFORMEE DE HOUGH GENERALISEE.

Chaque point (X, Y) du contour du prototype est indexé par ϕ , l'angle entre \vec{X} et le vecteur $\overrightarrow{(x_c, y_c)(X, Y)}$. Chaque ϕ correspond à un indice de ligne de la R-Table. Les valeurs possibles de ϕ sont définies de 0 à π et discrétisées arbitrairement en fonction de la précision souhaitée. Cette précision est limitée par celle du calcul de la tangente qui est elle-même limitée par la résolution de l'image modèle. La R-Table est construite en ajoutant les deux paramètres r et β sur la ligne d'indice ϕ tel que :

$$\begin{cases} r = \sqrt{(X - x_c)^2 + (Y - y_c)^2} \\ \beta = \text{atan}((Y - y_c) / (X - x_c)) \end{cases}$$

D'où la forme de la R-Table :

$\phi_1 = 0$	$(r, \beta)_{1_1}$	$(r, \beta)_{1_2}$	\dots	$(r, \beta)_{1_{n_1}}$
\dots	\dots	\dots	\dots	\dots
ϕ_j	$(r, \beta)_{j_1}$	$(r, \beta)_{j_2}$	\dots	$(r, \beta)_{j_{n_1}}$
\dots	\dots	\dots	\dots	\dots
$\phi_k = \pi$	$(r, \beta)_{k_1}$	$(r, \beta)_{k_2}$	\dots	$(r, \beta)_{k_{n_1}}$

c. Usage de la R-Table

L'exploitation de la R-Table et la détection de cette forme modèle dans une image fonctionnent alors comme suit :

Pour chaque point (x, y) issu d'un contour dans l'image à examiner ayant un gradient tel que $|G(x, y)| > \text{SeuilGradient}$, nous calculons ϕ et cherchons l'indice ϕ_i correspondant le plus proche dans la R-Table.

Ensuite pour chaque couple $(r, \beta)_i / i = 1, \dots, n$ dans la ligne ϕ_i de la R-Table, nous devons calculer les coordonnées du centre théorique de la forme :

$$x_c = x + r \cos(\beta),$$

$$y_c = y + r \sin(\beta),$$

et incrémenter l'élément correspondant dans une matrice d'accumulation H

$$H(x_c, y_c) = H(x_c, y_c) + 1$$

Comme pour les méthodes de Hough précédentes, les maxima locaux de H satisfaisant $H(x_c, y_c) > \text{SeuilPic}$ déterminent alors une possible reconnaissance de la forme modèle dans l'image, de centre (x_c, y_c) .

d. Exemples et applications

La Figure 54 présente un exercice d'étude théorique de l'application de la GHT. La forme à détecter est la silhouette stylisée d'un lapin dans la Figure 54A. Une fois la R-table générée pour cette forme, une GHT est appliqué sur l'image de la Figure 54B. Nous obtenons l'accumulateur Figure 54C. Les intensités des valeurs de l'accumulateur sont ici représentées en log pour rendre plus visible les effets de la GHT sur les autres formes présentes dans l'image. La localisation du pic le plus fort correspond à la position du lapin que nous cherchions dans l'image, Figure 54D.

Un exemple concret d'application dans le domaine de l'imagerie médicale est présenté Figure 55 d'après (Long, Antani, et Thoma 2005). Dans cet exemple il s'agit de localiser sur un cliché radiographique (Figure 55a) la position de quatre vertèbres cervicales. Un modèle de la forme recherchée préalablement défini est utilisé (Figure 55d). L'application de la GHT donne l'accumulateur Figure 55e qui laisse apparaitre clairement des pics qui permettent la détection et le positionnement des vertèbres cervicales sur l'image Figure 55f.

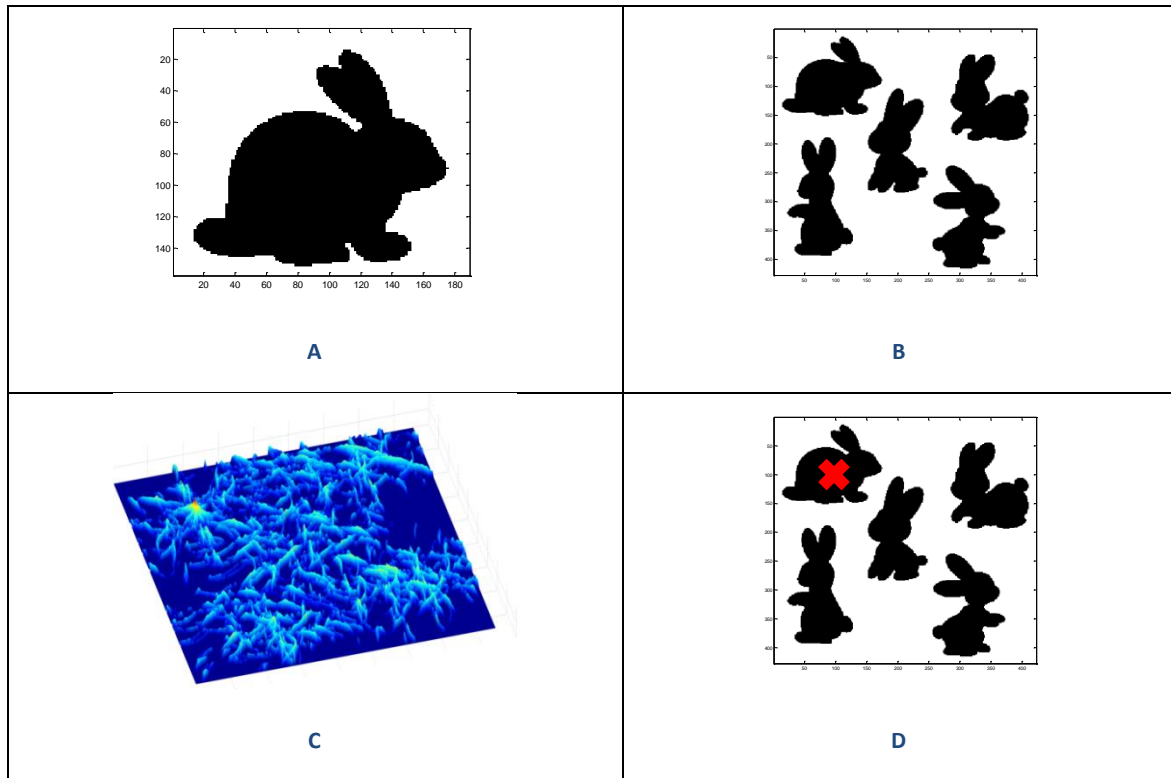


FIGURE 54 EXEMPLE D'APPLICATION DE LA TRANSFORMÉE DE HOUGH GÉNÉRALISÉE: A) LA FORME MODÈLE, B) L'IMAGE OU CHERCHER LE MODÈLE, C) L'ESPACE DES VOTES REPRÉSENTÉ EN LOG, D) LA POSITION DU PIC PRINCIPAL DANS L'IMAGE

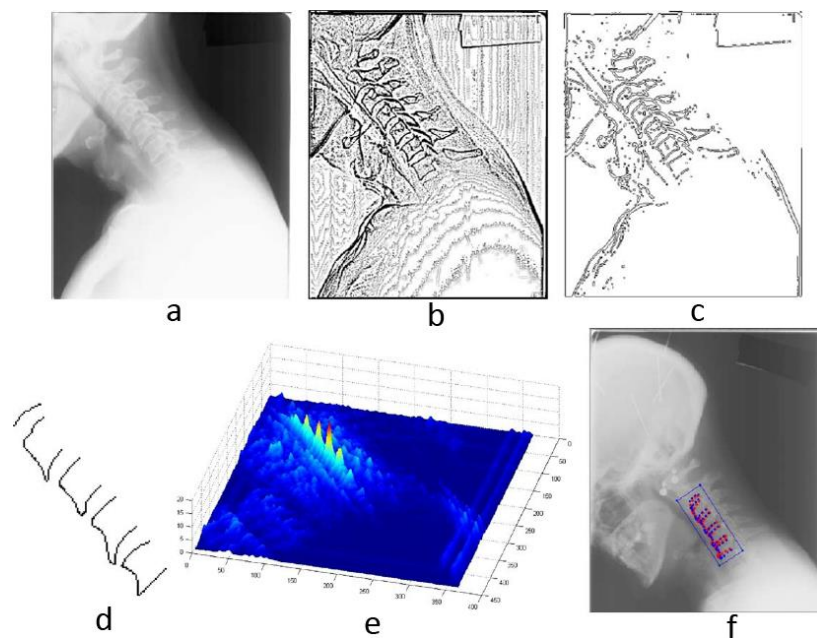


FIGURE 55 AUTRE EXEMPLE D'APPLICATION DE LA TRANSFORMÉE DE HOUGH GÉNÉRALISÉE (A) ORIGINAL CERVICAL SPINE IMAGE; (B) IMAGE AFTER UNSHARP MASKING TO ENHANCE EDGES; (C) IMAGE AFTER EDGE DETECTION, (D) CERVICAL SPINE SHAPE TEMPLATE; (E) HOUGH SPACE VALUES PLOTTED IN 3D; HIGHEST PEAK IS GHT ESTIMATE FOR POSITIONING TEMPLATE IN THE IMAGE; (F) FINAL RESULT, SHOWN BY OVERLAYING GHT-POSITIONED/ORIENTED/SCALED TEMPLATE ONTO ORIGINAL IMAGE. A COMPUTED BOUNDING BOX FOR THE RESULT IS ALSO SHOWN.

IV. Présentation du cas applicatif de ces travaux

NOUS PRESENTONS DANS CE CHAPITRE L'EXPERIENCE SCIENTIFIQUE QUI SERT DE BASE A CE TRAVAIL. NOUS PRESENTONS ENSUITE LE SYSTEME D'ACQUISITION ET LES IMAGES CAPTEES. NOUS TERMINONS CE CHAPITRE PAR UN EXPOSE DES DIFFICULTES LIEES AU TRAITEMENT DE CES IMAGES ET INHERENTES AUX CONTRAINTES DE L'EXPERIENCE.

1. Le protocole expérimental.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Stéphane Guyot, nous avons étudié un lot de 139 images issu d'une étude sur le stress osmotique de levures menée dans le laboratoire PAM. Ce lot d'images a été acquis tout au long d'une expérience qui s'est déroulée sur plusieurs mois.

Durant cette expérience, des levures *Saccharomyces Cerevisiae* CBS1171 ont été maintenues à 4°C (3 semaines maximum) sous forme de colonies sur un milieu Malt Wickerham modifié, additionné de 20 g/l d'agar (VWR International, Limonest, France).

Le milieu de Malt Wickerham modifié était, lui, composé de 10 g de glucose (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 3 g de peptone pancréatique (VWR International), 3 g d'extrait de levure (Sigma-Aldrich) et 1,5 g de NaH₂PO₄ (VWR International) dans 1 litre d'eau et de glycérol (Sigma-Aldrich), qui présentait une pression osmotique de 1,38 MPa [5,1 g de glycérol pour 100 g d'eau distillée ; le pH était ajusté à 5,35 par addition d'acide orthophosphorique (Sigma-Aldrich)].

Une préculture est initialement préparée par inoculation d'une colonie dans 50 ml de milieu de Malt Wickerham modifié ajusté à 1,38 MPa et conditionné dans une fiole Erlenmeyer de 250 ml. La préculture était maintenue à 25 °C pendant 48 h sous agitation à 250 rpm. Pour chaque préculture, deux cultures ont ensuite été préparées par inoculation de 100 µl dans 50 ml de milieu Malt Wickerham modifié et ajusté à 1,38 MPa. Une culture a été repiquée toutes les 24h dans un milieu frais (Malt Wickerham modifié) ajusté à 1,38 MPa (témoin) alors que l'autre culture a été soumise à une augmentation progressive de la pression osmotique à raison de 1,5 MPa toutes les 24 h (rampe).

Toutes les 24 h, la totalité des levures de chaque culture (témoin et rampe) a été récoltée par centrifugation (2,880 x g à 25 °C pendant 5 min) ; à la suite de quoi le culot cellulaire a été repris dans 50 ml de milieu approprié avant d'être transvasé dans un erlenmeyer de 250 ml ultérieurement incubé à 25 °C pendant 24 h sous agitation (250 rpm).

La pression osmotique des milieux de culture a été ajustée en solubilisant les poudres (glucose, peptone pancréatique, NaH₂PO₄, extraits de levure) dans une solution binaire d'eau/glycérol (à pression osmotique désirée) et dont les proportions d'eau et de glycérol ont été déterminées selon l'équation de Norrish (Norrish 1966). Pour chaque milieu, la pression osmotique a été contrôlée par la mesure de son activité de l'eau (Decagon Devices Inc., Decagon Devices Europe, Dardilly, France). Un volume de 100 µl de culture à différents niveaux de pression osmotique a été déposé entre une lame de Malassez et une lamelle. Les échantillons ont été observés au microscope après 3 minutes afin de permettre aux levures de sédimer.

2. L'obtention des images

Les prises de vue microscopiques ont été réalisées à l'aide du plateau technique DImaCell / PIMS (Plateau d'IMagerie Spectroscopique). DImaCell offre aux équipes de l'UMR PAM des techniques d'imagerie dédiées à l'observation en temps réel de perturbations environnementales appliquées aux microorganismes d'intérêt, telles que la pression, la température ou encore l'oxydation. Les échantillons observés vont des microorganismes (levures, bactéries, champignons filamenteux) aux macromolécules et biopolymères (matrices alimentaires, émulsions, films d'emballage fonctionnalisés).



FIGURE 56 UN MICROSCOPE DU PLATEAU TECHNIQUE DIMACELL

Les cellules de levure ont été visualisées en utilisant un microscope droit (Axioplan 2imaging, Zeiss, Marly le Roi, France) équipé d'une caméra noir et blanc (AxioCam MR, Zeiss) pilotée par le logiciel AxioVision Rel 4.8.0.0 (Zeiss). Ce dispositif produit des images au format TIFF de 1296×1026 pixels en 256 niveaux de gris codés sur 8 bits. Un objectif Plan-Apochromat x63/1.4 à immersion dans l'huile (Zeiss) a été utilisé pour observer les cellules.

Au total, 139 images ont été prises dans le cadre de cette expérience, mais seulement 137 ont été sélectionnées pour l'étude, car 2 images ne montraient qu'une partie inexploitable de la grille.

Lors du traitement de ces images, deux types majeurs de difficultés ont été rencontrés :

1. D'une part ceux liés à la chaîne d'acquisition.
2. D'autre part, ceux intrinsèques au protocole de l'expérience elle-même.

À ce titre, nous pouvons citer :

- ✓ **Échelle** : Les 137 images sont de mêmes dimensions, 1296×1026 pixels, mais à l'analyse, nous remarquons une variabilité sur le plan de la résolution spatiale. Cela signifie que la grille de Malassez n'a pas la même échelle dans toutes les images étudiées. Il apparaît donc des contraintes de souplesse et de robustesse pour la détection et la caractérisation de l'objet grille.
- ✓ **Illumination** : Selon l'opérateur qui a réalisé les acquisitions et le type d'échantillon observé, il existe une grande variabilité dans l'illumination de l'image (Figure 57 a, b). Il existe également un gradient dans cette illumination selon le positionnement de la source lumineuse.
- ✓ **Contraste** : Le contraste est également inégal d'une image à l'autre (Figure 57 b, c).
- ✓ **Orientation** : Au cours de ces acquisitions, des variations dans l'orientation de la grille sont apparues lorsque les lames n'étaient pas correctement positionnées sous le microscope. Cette situation résulte de l'absence de système de verrouillage de la lame sous le microscope (Figure 57 d, e).
- ✓ **Dé-focalisation** : Selon le type de soluté utilisé, sa concentration, la dé-focalisation liée à la diffraction de la lumière et la réduction de la profondeur du champ peut devenir très marquée et entraîner des difficultés de mise au point (Figure 57e,g).
- ✓ **Bruit** : D'autres perturbations telles que le bruit électronique, la contamination des solutés par des particules et/ou une densité cellulaire élevée, peuvent conduire à une mauvaise visibilité de la grille ou des cellules (Figure 57 f, g, h).

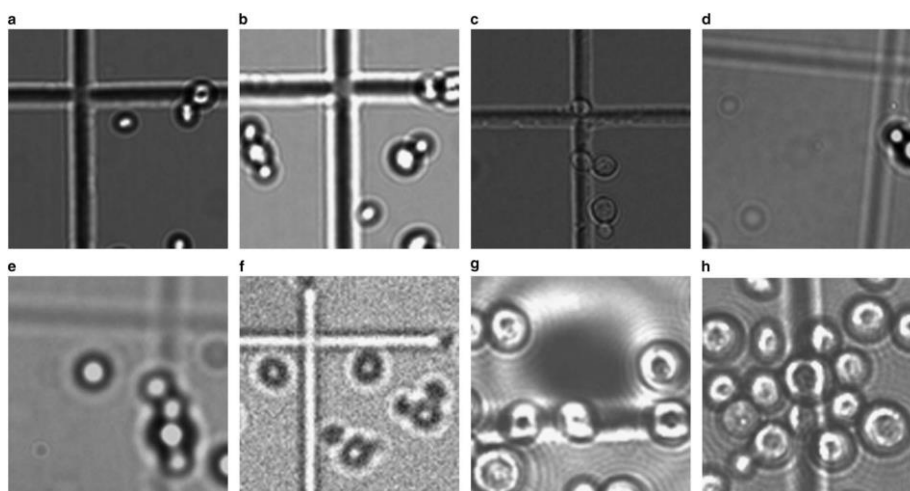


FIGURE 57 ECHANTILLONS REPRESENTATIFS DE L'HETEROGENEITE DES IMAGES.

Ces difficultés sont autant de défis à relever pour le traitement d'image afin de pouvoir répondre aux interrogations des expérimentateurs.

V. Les contributions

NOUS PRESENTONS, AU DEBUT DE CE CHAPITRE, LA STRATEGIE QUE NOUS AVONS MISE EN ŒUVRE POUR TRAITER LES IMAGES DE NOTRE LOT. NOUS PRESENTONS DEUX APPROCHES POSSIBLES POUR ABORDER LE PROBLEME DE LA DETECTION ET DE LA CARACTERISATION DE LA GRILLE DANS LES CELLULES DE MALASSEZ, PUIS NOUS PRESENTONS LES TROIS ARTICLES QUI S'ATTACHENT A DECRIRE LES RESULTATS OBTENUS. DANS CETTE SECTION FIGURE EGALEMENT UN PARAGRAPHE CONSACRE A L'APPORT QUE PEUT AMENER L'INTRODUCTION DE DEUX STRUCTURES DE DONNEES ET UN TRAVAIL SUR L'APPORT DE L'ANALYSE STATISTIQUE DES ACCUMULATEURS.

1. La détection et la caractérisation de la grille

Pour extraire automatiquement les informations utiles aux biologistes, nous devons traiter les images brutes de cultures étalées sur lame de Malassez issues du microscope.

La grille est un élément important de notre problématique. Elle constitue d'une part un objet de référence qu'il faut savoir détecter et caractériser afin de ne considérer que les cellules présentes en son sein. Effectivement, seules les cellules présentes à l'intérieur des zones de comptage de la grille doivent être comptées, c'est ce qui garantit la validité du calcul de la concentration cellulaire par le biais de l'Équation 2. Par ailleurs, la grille constitue un artefact nuisible à la segmentation et au comptage des cellules elles-mêmes. Il faudra savoir l'éliminer afin de ne pas perturber et/ou fausser le comptage. Pour atteindre ces objectifs, nous avons examiné deux approches.

- L'approche spatiale : travail direct sur les pixels de l'image avec les outils adéquats proposés dans la littérature, tels que des techniques de seuillage, les techniques de morpho mathématiques, ou toute autre technique de manipulation directe des pixels de l'image.
- L'approche fréquentielle : travail sur la traduction de l'image dans l'espace des fréquences par le biais d'une DFT 2D. Cette approche fréquentielle ne donne pas la possibilité de travailler au niveau du pixel, mais elle offre l'avantage de pouvoir traiter certains aspects de l'image d'un point de vue global.

Nous examinerons dans une première partie l'approche spatiale, puis dans la partie suivante, l'approche fréquentielle, et nous comparerons les résultats.

a. L'approche spatiale

i. *Les morpho-mathématiques pures*

Dans le contexte du comptage de cellules sur grille (de Malassez ou autre), des tentatives d'identification et d'élimination de la grille ont déjà été entreprises. Nous pouvons citer notamment, à titre d'exemple, les travaux de (Chen et Chiang 2011) qui ont proposé une solution simple basée exclusivement sur les morpho-mathématiques.

La méthode décrite doit permettre de trouver la grille, de l'éliminer puis de compter les cellules. Elle se décompose en plusieurs étapes :

- La première étape correspond à une phase de binarisation¹⁴ de l'image. Dans le cas décrit par Chen et Chiang (Chen et Chiang 2011), cela ne présente aucune difficulté, les cellules et la grille étant clairement distinctes du fond. La Figure 58 montre cette étape de binarisation.
- La seconde étape consiste à identifier et isoler les 16 carrés constituant la zone d'intérêt de la grille (Figure 59). Pour ce faire, un algorithme de morphologie mathématique de type 'hole filling' est utilisé. Cela a pour effet de remplir en blanc les zones noires entourées de pixels blancs. Ensuite, seules les 16 zones ayant la plus grande surface sont conservées. Les petits trous sont à leur tour bouchés en utilisant à nouveau le « hole filling ».

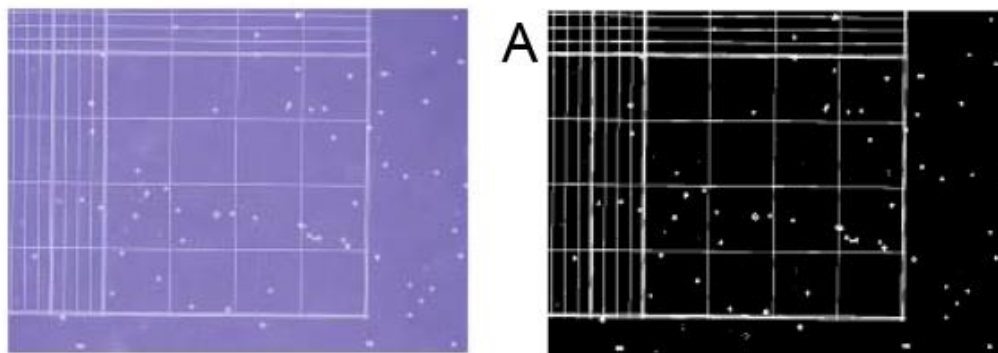


FIGURE 58 BINARISATION DE L'IMAGE DE LA GRILLE. A GAUCHE IMAGE ORIGINALE, A DROITE IMAGE BINARISEE QUE NOUS LABELISERONS « A »

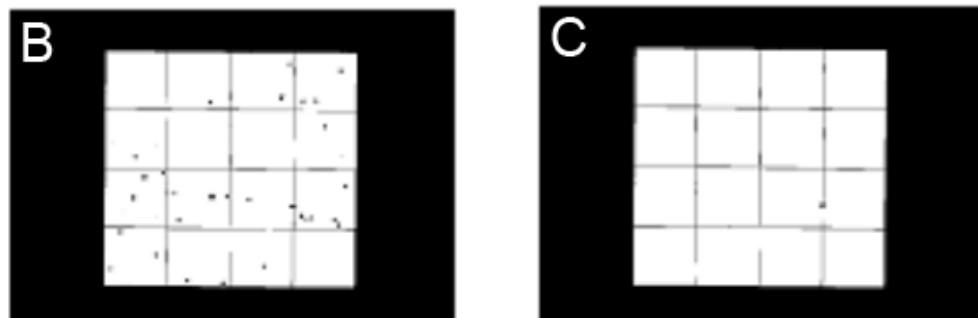


FIGURE 59 UTILISATION DU HOLE FILLING. A GAUCHE IMAGE LABEL B MONTRANT LES 16 PLUS GRANDES ZONES, A DROITE, IMAGE LABEL C APRES LE REMPLISSAGE PAR UN HOLE FILLING DES PETITS TROUS

¹⁴ En traitement d'image, la binarisation est une opération qui produit deux classes de pixels, en général, ils sont représentés par des pixels noirs et des pixels blancs.

- La méthode se poursuit par l'élaboration d'une R.O.I.¹⁵ (Figure 60) en utilisant une dilatation avec un élément structurant carré de $2d$ de côté, d correspondant à la longueur du côté du carré englobant les 16 plus petits carrés. La grille est isolée via une opération binaire XOR¹⁶ sur l'image tel que :

$$\text{Image } E = \text{image } D \text{ xor image } C.$$



FIGURE 60 DETERMINATION DE LA R.O.I. ET EXTRACTION DE LA GRILLE. À GAUCHE IMAGE D DE LA R.O.I., A DROITE, IMAGE E LA GRILLE ISOLEE VIA D XOR C

- Enfin, dans la dernière étape, l'image D, Figure 60, formant la R.O.I. et l'image E (Figure 60) de la grille sont utilisées comme masques sur l'image binarisée pour éliminer la grille et le cadre dans l'image A (Figure 58). Après quelques opérations de seuillage et une opération supplémentaire de morpho mathématique (ouverture) pour éliminer les « restes » de grille, il est aisé de segmenter les cellules et ainsi de les compter, voir Figure 61.

¹⁵ Region Of Interest : zone d'intérêt.

¹⁶ Xor : ou exclusif

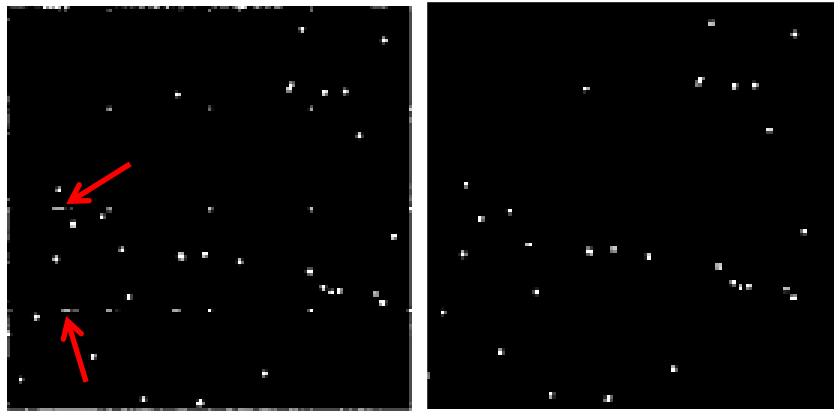


FIGURE 61 EFFACEMENT DE LA GRILLE. À GAUCHE CELLULES ET RESIDUS DE GRILLE (FLECHES ROUGES), A DROITE CELLULES SEGMENTEES.

Bien que Chen et Chiang (Chen et Chiang 2011) montrent les performances de cette approche, elle présente plusieurs problèmes par rapport à notre cas applicatif :

Pour commencer, à la première étape, la binarisation de nos images fournit un résultat inexploitable à cause du bruit de fond et de la présence fréquente d'un gradient d'illumination. Afin d'éliminer ce gradient d'illumination, il sera nécessaire d'effectuer un prétraitement des images.

À la seconde étape, rien ne garantit que les 16 plus grandes zones correspondent aux carrés recherchés. En effet, ceci est particulièrement vrai si une cellule est placée sur un barreau de la grille, « un trou » dans un barreau peut alors conduire l'algorithme de « hole filling » à fusionner deux carrés contigus de la zone de comptage. Cette fusion accidentelle de deux carrés conduirait inévitablement à considérer comme un carré valide, la 16e plus grande surface suivante qui pourrait s'avérer être toute autre chose qu'un des 16 carrés cherchés.

La troisième étape implique une connaissance a priori de la taille de la grille (d). Les auteurs n'indiquent pas comment ils déterminent ce paramètre par calcul ni même s'ils le font par calcul. Cela implique : soit un protocole d'acquisition particulièrement rigide pour que d soit toujours le même d'une image à l'autre, soit une connaissance a priori de cette valeur, ce qui n'est pas acceptable pour un algorithme robuste et automatique tel que nous l'envisageons.

La dernière étape laisse des traces résiduelles de la grille qu'il est difficile, sans a priori, de distinguer des cellules (Figure 61). De plus, les cellules situées sur un barreau sont inévitablement détruites ou altérées par l'élimination de la grille.

L'algorithme décrit dans (Chen et Chiang 2011) fonctionne dans certains cas applicatifs les plus simples. Cependant, de par son approche spatiale réduite à sa plus simple expression (le pixel), il n'est capable de reconnaître une grille que comme un ensemble de pixels connectés dans une gamme étroite de

niveau de gris. De plus, lorsque le remplissage des trous est traité, si la grille n'est pas parfaitement intacte, cette méthode donnera un résultat erroné (fusion de deux des 16 carrés).

Cet algorithme a néanmoins été implémenté et testé sur l'échantillon de 137 images issu de notre laboratoire et, comme nous pouvions nous y attendre, cette méthode a échoué sur toutes les images que nous devons traiter, et ce en raison de la grande variabilité de notre échantillon.

Quelles que soient les qualités intrinsèques de cette technique, l'approche morpho mathématique seule paraît inappropriée pour résoudre le problème de la détection et de l'effacement de la grille dans notre contexte. Une approche différente et plus robuste aux conditions de l'expérience est nécessaire.

ii. Application de la transformée de Hough linéaire sur l'image de la grille de Malassez

Dans le lot d'images issues de l'expérience, la grille de Malassez est constituée de onze lignes droites. En première approche, l'idée d'employer la transformée de Hough directement sur les contours de ces images semble naturelle.

Les images doivent préalablement être traitées pour être débarrassées du défaut d'illumination et du bruit de fond électronique (voir le paragraphe « Traitement initial des images » page 105). Cela fait, nous pourrions utiliser une transformée de Hough linéaire pour trouver les onze lignes qui forment la grille.

La transformée de Hough linéaire fonctionne sur les points de contours d'une image comme nous l'avons vu dans le chapitre « La transformée de Hough linéaire » page 60. Nous réalisons donc dans un premier temps un filtrage de Canny (Canny 1986) pour mettre en évidence ces contours dans l'image, voir Figure 62.

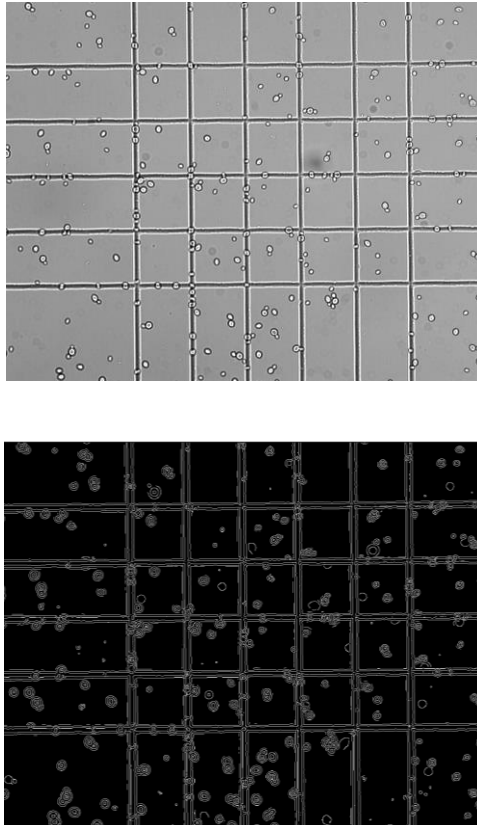


FIGURE 62 EXTRACTION DES CONTOURS PAR FILTRAGE DE CANNY

Nous appliquons ensuite une transformée de Hough linéaire sur ces contours, ce qui permettra de mettre en évidence les alignements de pixels constitutifs des barreaux de la grille. Dans l'espace des paramètres, nous observons clairement apparaître des zones de haute intensité (Figure 63). Si nous relevons les paramètres θ, ρ correspondant aux onze zones d'intensité maximale, nous obtenons les paramètres de onze droites que nous pouvons tracer et superposer à l'image des contours.

Nous constatons alors que ces onze droites ne sont pas tout à fait celles que nous espérions. Certains barreaux de la grille n'ont pas été détectés tandis que d'autres ont été sélectionnés plusieurs fois (Figure 64). Pour comprendre ce résultat, il est important d'étudier l'espace des paramètres afin de comprendre le mécanisme de détermination des pics de haute intensité.

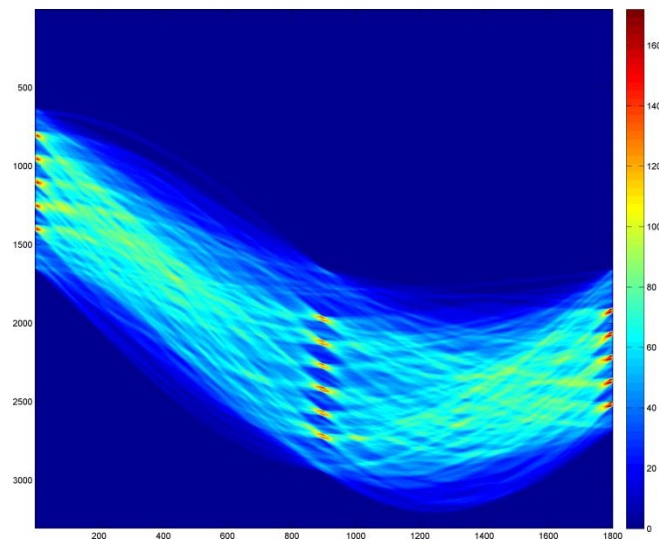


FIGURE 63 ESPACE DES PARAMETRES DE LA TRANSFORMEE DE HOUGH

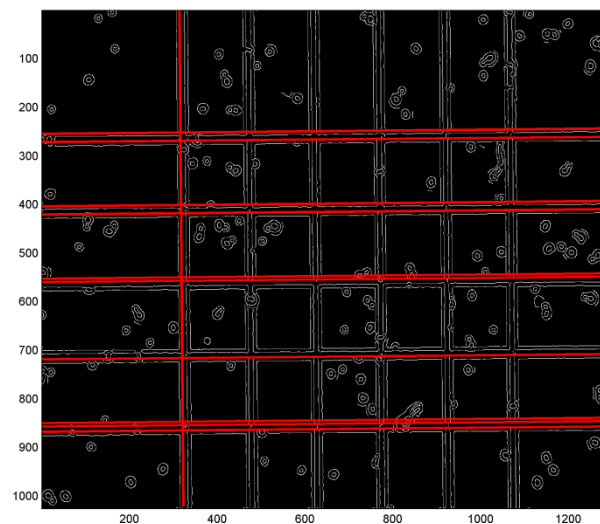


FIGURE 64 IMAGES DES CONTOURS AVEC, EN SURIMPRESSON ROUGE, LES 11 LIGNES DROITES DETECTEES PAR LA TRANSFORMEE DE HOUGH.

Dans un premier temps, un agrandissement¹⁷ sur l'un des pics de haute intensité nous permet de constater qu'il est en réalité constitué par l'agrégation de quatre pics plus petits. Ceux-ci correspondent à quatre lignes parallèles constituant chaque barreau de grille tel que décomposé par le filtre de Canny, voir la Figure 65.

¹⁷ En affinant les paramètres de discrétisation de l'espace des paramètres tel que décrit dans la Figure 32

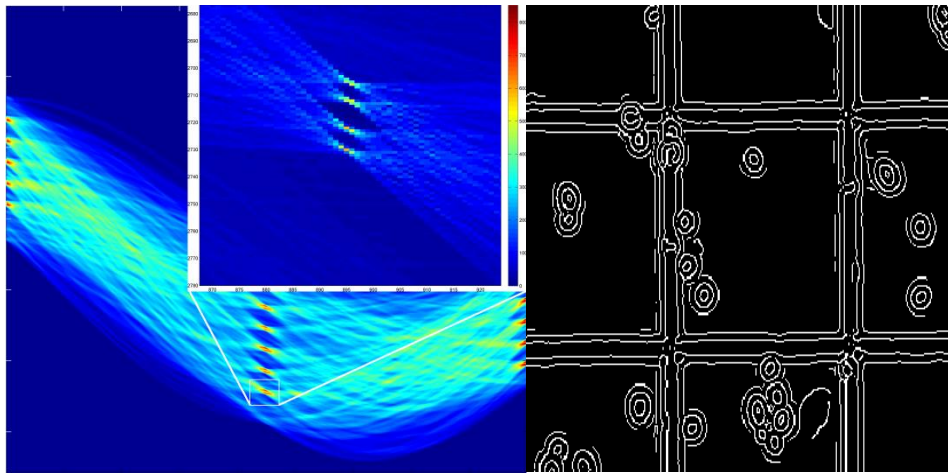


FIGURE 65 DETAIL D'UN PIC DANS L'ESPACE DES PARAMETRES. À GAUCHE L'ESPACE DES PARAMETRES, A DROITE, LA DECOMPOSITION DES BARREAUX DE GRILLE EN 4 LIGNES DE CONTOURS PARALLELES PAR LE FILTRE DE CANNY.

Ce résultat se comprend si nous examinons en détail le profil d'un barreau de la grille, voir sur la Figure 66 l'action du filtre de Canny sur ce type de profil.

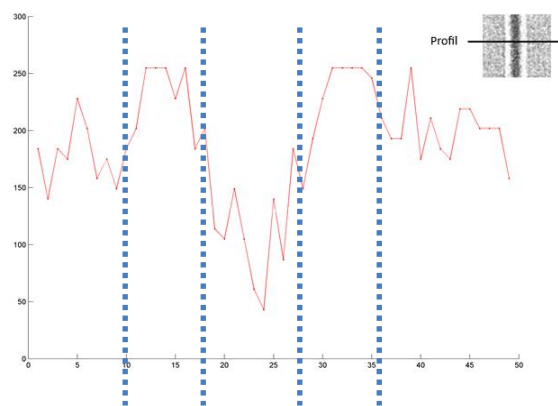


FIGURE 66 : PROFIL D'UN BARREAU DE LA GRILLE : EN ROUGE VARIATIONS DE NIVEAU DE GRIS D'UN BARREAU DE LA GRILLE, LIGNES BLEUES, PRESENCE D'UN CONTOUR SELON CANNY

Dans ces conditions, il est probablement nécessaire de rechercher non pas onze lignes, mais quatre lignes par barreau soit 44 lignes dans le cas de cette image. Se pose également ici le problème de la détermination automatique des bons paramètres de discrétisation de l'espace de Hough.

Par ailleurs, l'algorithme utilisé pour déterminer la position des pics dans la matrice d'accumulation (l'espace des paramètres) doit également être étudié. Matlab® implémente une fonction « *houghpeaks* » qui détermine la position des n plus grand pics dans l'accumulateur. Pour ce faire, cette fonction utilise un seuil arbitraire ou estimé dynamiquement par la relation suivante :

ÉQUATION 5

$$threshold = 0.5 * max(H),$$

avec H la matrice d'accumulation, $\max()$ la fonction renvoyant la valeur maximale de la matrice passée en paramètre.

Ce type d'approche est conforme à ce que la littérature propose couramment, modulo le facteur de 0.5 qui peut être choisi à discrétion de l'utilisateur en fonction de son application ; Davies proposait 0.7 (Davies 1988).

Le réglage par défaut à 0.5 implique comme postulat que toutes les lignes de l'image seront à peu près constituées d'un même nombre de pixels alignés avec une tolérance de 50% sur ce nombre. De façon plus précise, un alignement de N pixel engendrera un pic de hauteur $O(N)$ dans l'accumulateur et un alignement de $n < N$ pixels ne sera pris en compte que si $O(n) > 0.5 * O(N)$.

C'est un postulat, il est donc possible de débattre de sa valeur, mais dans le cas particulier des images de la grille de Malassez que nous devons traiter, toutes les lignes ont environ le même nombre de pixels et ce réglage semble raisonnable. En outre, la recherche de pics est ici un processus itératif. Quand la valeur maximale de H est déterminée, ses coordonnées sont mémorisées puis cette valeur est remplacée dans H par une valeur nulle ou égale au minimum de la matrice. La recherche du maximum suivant se poursuit jusqu'à ce que la valeur maximale trouvée à la $n^{\text{ième}}$ itération soit inférieure au seuil *threshold*. Dans le cas de pixels parfaitement alignés le long d'une droite, l'intersection des sinusoides dans l'espace des paramètres est ponctuelle, voir la Figure 36. Dans le cas de points moins bien alignés, lorsque la dispersion autour de la droite de support s'accroît, la zone d'intersection des sinusoides dans H forme alors une tache plus diffuse, voir la Figure 35. Dans le cas diffus, il faut prendre garde aux contreforts du pic qui peuvent être eux-mêmes d'une intensité supérieure à la valeur seuil *threshold*. Le risque est alors que, lors du processus itératif, ces contreforts soient pris à leur tour pour des pics valides ce qui entraînerait la détection de fausses droites plus ou moins colinéaires à celle émanant du pic initial.

Pour éviter ce problème de faux positif, la fonction *houghpeaks* utilise un système de masquage. Un paramètre de voisinage appelé *NHoodSize* est utilisé. Ce paramètre définit une zone d'exclusion carrée, de côté égale à $2 * NHoodSize$ et centrée sur le pic.

Lors du processus itératif, cette zone d'exclusion est entièrement mise à zéro après la détection d'un maximum. Par défaut, Matlab® définit cette valeur à 1/50 de la taille de l'image. Dans notre application, les images ont 1280 pixels de large, ce qui donne une valeur de *NHoodSize* de 25 pixels

environ. Cette zone d'exclusion sera donc un masque de 25 pixels de part et d'autre du pic soit 676 pixels masqués¹⁸.

Pour notre application, une telle valeur est problématique, car elle est supérieure à l'écart entre deux pics comme nous pouvons le constater sur la Figure 65, où cet écart est d'environ 5 pixels. Une solution est alors de fixer cette valeur en tenant compte de l'écartement des lignes constitutives d'un barreau de la grille. Si nous fixons une limite trop basse, nous aurons des faux positifs trop nombreux. A contrario, si nous fixons cette limite trop haute, ce sont les faux négatifs qui seront en hausse et nous manquerons certains barreaux de la grille.

Empiriquement et au regard des 137 images que nous avons étudiées, nous avons défini la valeur de *NHoodSize* à 5 pixels (36 pixels masqués). Les résultats présentés Figure 67 sont alors bien meilleurs dans ces conditions. Les 4 lignes de chaque barreau sont bien identifiées conformément à ce que nous recherchions.

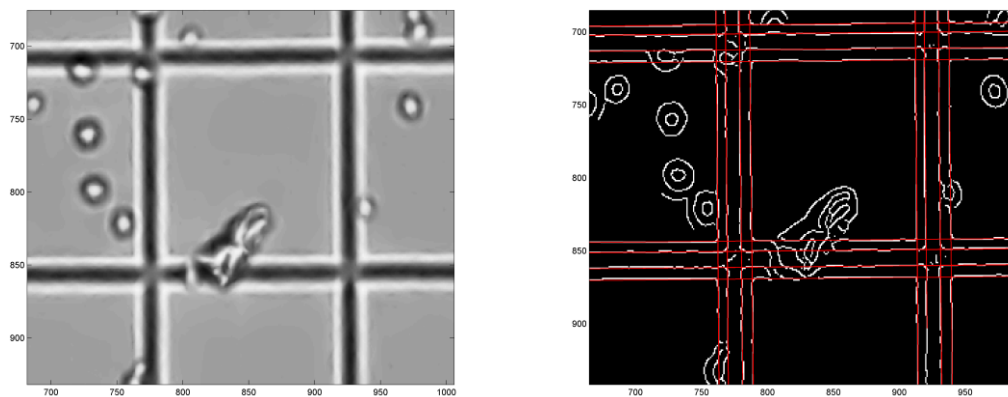


FIGURE 67 APPLICATION D'UN FILTRE DE CANNY ET TRANSFORMEE DE HOUGH SUR UNE IMAGE. À GAUCHE, L'IMAGE SOURCE, A DROITE, L'IMAGE FILTRÉE PAR LE FILTRE DE CANNY ET LES LIGNES DROITES DÉTECTÉES PAR LA TRANSFORMÉE DE HOUGH EN SURIMPRESSION ROUGE.

Les résultats montrent que la transformée de Hough est un outil efficace. Cependant, et malgré ces précautions, rien ne garantit au final que les 44 meilleures lignes (au sens des 44 meilleurs pics) soient bel et bien celles que nous cherchons. Le problème est le même que pour (Chen et Chiang 2011) et les 16 plus grandes surfaces. En effet, l'expérience prouve que la décomposition de certains barreaux peut se faire en une, deux, trois ou même en six lignes de contours comme dans les exemples présentés Figure 68.

¹⁸ Nombre de pixels masqués = $(NHoodSize + 1)^2$

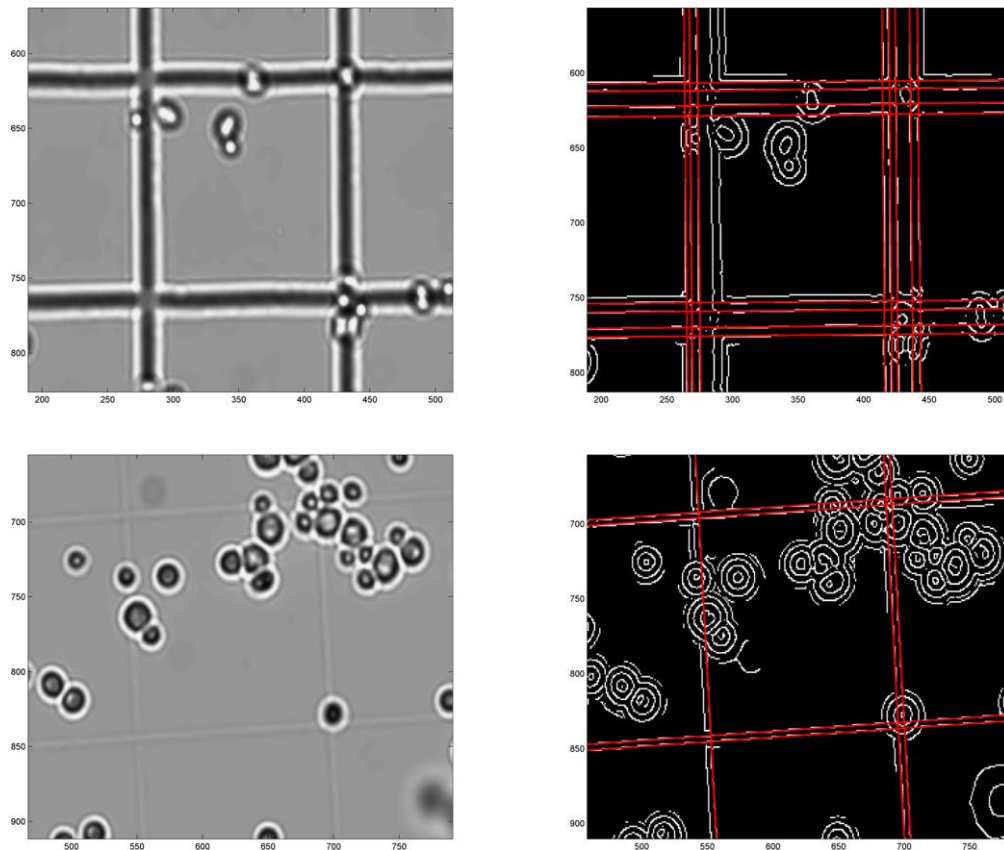


FIGURE 68 CAS DE DECOMPOSITION DE BARREAUX DE GRILLE EN 6 LIGNES CONDUISANT A MAL IDENTIFIER UN BARREAU (HAUT) ET UNE OU DEUX LIGNES (EN BAS).

Nous constatons que la faiblesse de cette approche provient plutôt de la détection des contours par le filtre de Canny que de la transformée de Hough elle-même. Le filtre de Canny fonctionne correctement, mais il y a une différence notable entre ce que nous espérons de ce filtre et le résultat produit. Nos attentes sont plutôt d'ordre sémantique alors que ce filtre de détection de contour fonctionne à un niveau plus élémentaire, celui des pixels (Figure 1). Par ailleurs, l'hétérogénéité des images de l'échantillon induit une multiplicité des décompositions produites par le détecteur de contour, ce qui conduit à de multiples ajustements de paramètres. Ces nombreux ajustements au cas par cas sont autant de freins à l'automatisation et la robustesse de cette approche. Un travail complémentaire est alors nécessaire pour associer chaque ligne à un barreau pour tendre vers l'idée sémantique que nous avons de la grille.

iii. Emploi combiné de la transformée de Hough linéaire et des morpho-mathématiques

Pour relier l'ensemble des lignes découvertes par la transformée de Hough linéaire à l'image de la grille, nous avons fait appel à la capacité qu'ont les morpho-mathématiques à travailler sur des groupes de pixels.

Dans un premier temps, et en tenant compte des objections formulées dans le paragraphe précédent, nous traçons sur une image vierge les droites trouvées, en prenant soin de laisser un pixel de marge

au bord de l'image (nous expliquerons pourquoi par la suite**). En procédant ainsi, nous évitons également l'écueil des trous dans les barreaux créés par les cellules à cheval sur les barreaux rencontrés par (Chen et Chiang 2011), car nous partons d'un canevas vierge de toute trace de cellules.

Ensuite, nous utilisons une opération morpho-mathématique de fermeture: une première opération de dilatation avec un élément structurant carré de 20 pixels de côté. Le choix de la taille de l'élément structurant résulte d'un compromis entre la distance maximale entre deux lignes constitutives d'un même barreau et la distance entre deux barreaux. Nous effectuons ensuite une érosion avec le même élément structurant. De cette façon, nous aurons comblé les espaces « intérieurs » délimités par les lignes d'un même barreau sans altérer les dimensions des barreaux eux-mêmes. Nous notons l'image résultante *A* dans la Figure 69.

Nous appliquons une troisième opération de morpho-mathématique, un « hole filling », ce qui a pour effet de remplir de pixels blancs toutes les zones noires entourées de pixels blancs. Cela ne s'applique pas aux zones s'étendant de l'extérieure à la R.O.I. au bord de l'image, car nous avons pris soin de laisser un espace de 1 pixel au bord de l'image à l'étape initiale**. Nous notons l'image obtenue *B* dans la Figure 69.

La dernière image *C* est alors obtenue en appliquant l'arithmétique binaire suivante :

$$C = \text{not}(A) \& B.$$

Avec la fonction $\text{not}(x)$ qui donne l'inverse de x .

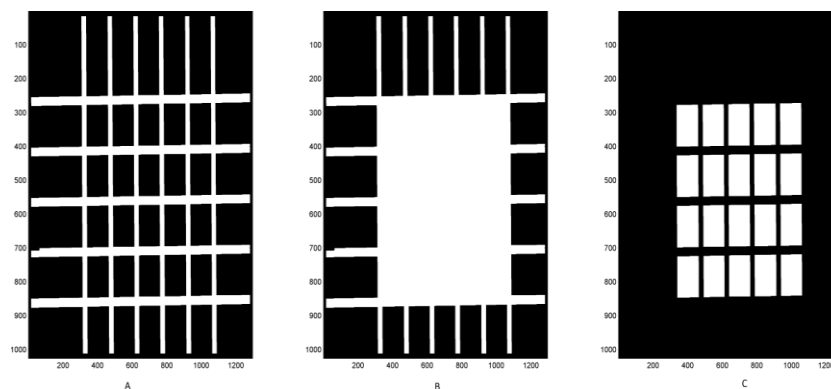


FIGURE 69 ISOLATION DE LA GRILLE ET DE LA R.O.I. À GAUCHE, L'IMAGE A DES BARREAUX DE LA GRILLE APRES FERMETURE, AU MILIEU, L'IMAGE B DE LA R.O.I. APRES LE HOLE FILLING, A DROITE, L'IMAGE RESULTANTE $C = \text{not}(A) \& B$

Pour mesurer la qualité de cette détection, nous avons réalisé la mesure suivante : à partir de l'image *C*, nous mesurons la surface de chacun des 20 carrés ainsi délimités. Cela nous permet d'obtenir un critère objectif de qualité du résultat via l'étude de la variabilité de cette surface. Nous utilisons alors la relation suivante pour calculer le coefficient de variation Cv de cette surface :

ÉQUATION 6 CALCUL DU Cv

$$Cv = 100 * \sigma(\text{Aires des carrés}) / \text{moyenne}(\text{Aires des carrés})$$

De manière théorique, cette variabilité doit être nulle, car chaque carré doit avoir la même surface et il ne doit donc y avoir aucune variation. En pratique, le mauvais positionnement d'un barreau aura un impact sur la surface des carrés adjacents qui seront soit trop grands, soit trop petits, faisant ainsi augmenter Cv .

Nous avons établi dans (Marin et al. 2014) qu'un écart de 1 pixel dans le positionnement d'un barreau de la grille induit un Cv d'environ 0.5, voir Table 1 de l'article 1. Nous avons traité les 137 images du lot et nous les avons réparties selon quatre catégories.

- $Cv < 1$, Grille parfaitement bien positionnée
- $1 \leq Cv < 2$ Grille très bien positionnée
- $2 \leq Cv < 5$ Grille bien positionnée
- $Cv \geq 5$ Grille mal positionnée ou non détectée.

Les résultats sont résumés dans le graphique des Figure 70 et Figure 71.

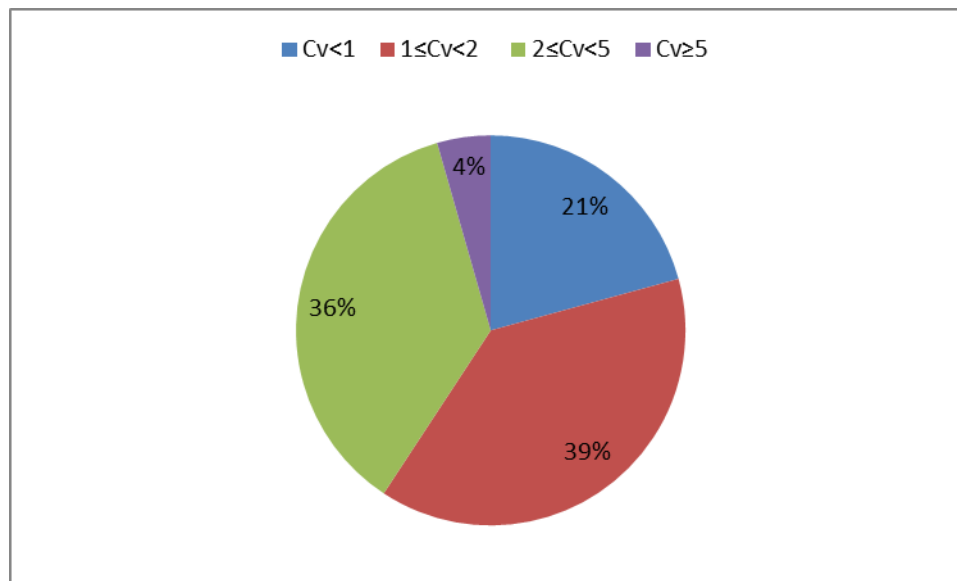


FIGURE 70 DISTRIBUTION DES 137 IMAGES EN FONCTION DU Cv

Dans 21% des cas, les grilles sont considérées comme très bien caractérisées avec $Cv < 1$ représentant une erreur moyenne de positionnement inférieur à 2 pixels.

Sur 80 images (60%), les grilles sont considérées comme bien caractérisées avec une erreur moyenne de positionnement inférieur à 4 pixels ($Cv \leq 2$).

La courbe Figure 71 présente les valeurs de Cv image par image et trié par ordre croissant de Cv . Le graphique est limité au maximum de $Cv = 5$, au-delà de cette valeur représentant une erreur cumulée de plus de 10 pixels sur le positionnement des barreaux, nous avons considéré que le positionnement et la géométrie de la grille étaient erronés. Cela concerne 6 images (4%).

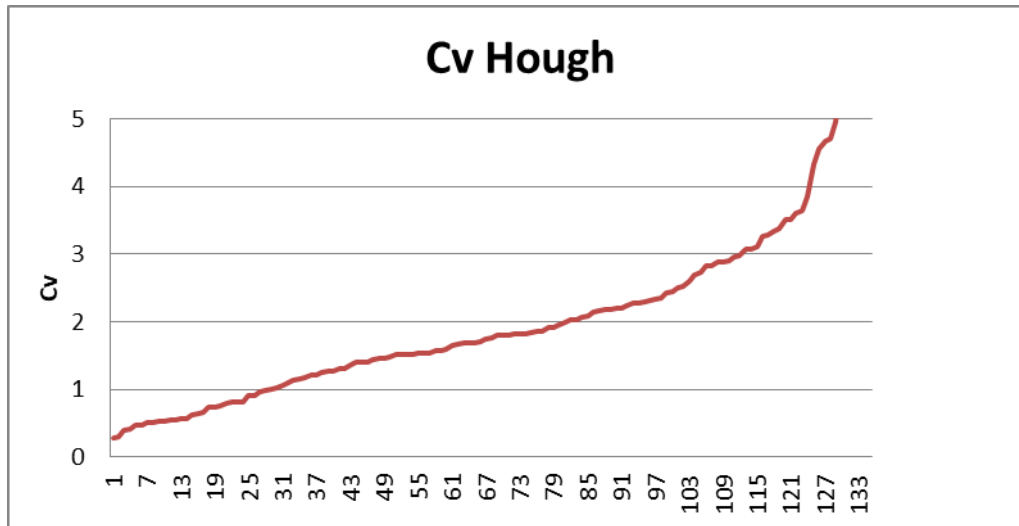


FIGURE 71 VALEURS DES Cv POUR LES 137 IMAGES TRAITEES AVEC LA TRANSFORMEE DE HOUGH.

Ces résultats sont acceptables compte tenu de l'hétérogénéité des images. Toutefois, même si les images de la Figure 69 A nous permettent de caractériser correctement la géométrie et le positionnement de la grille et que les images de la Figure 69 B nous permettent de déterminer la R.O.I avec précision, en aucune façon elles ne nous permettront d'effacer la grille sans altérer les cellules présentes sur les barreaux. Un effacement efficace des barreaux de la grille impliquerait une connaissance plus fine de son profil (voir Figure 66) ainsi qu'une méthode d'effacement laissant le fond et les cellules intacts ce qui n'est pas possible même en approfondissant encore l'approche spatiale.

Dans ce chapitre, nous avons exploré deux méthodes d'extraction et de caractérisation de la grille qui agissent dans le domaine spatial. Bien que les résultats soient relativement intéressants pour la seconde méthode en ce qui concerne le positionnement de la grille, celle-ci ne permet pas d'effacer la grille efficacement et n'autorise pas l'automatisation du traitement.

Il nous faut changer de paradigme et réviser notre façon de percevoir la grille.

b. La stratégie choisie : l'approche fréquentielle

Pour rappel, nous devons **localiser et caractériser la grille de la lame de Malassez**. Cette étape est capitale, car c'est grâce à cette grille que nous aurons un référentiel précis dans lequel faire le comptage pour ensuite remonter à la concentration cellulaire qui est l'objectif principal. Les lignes

représentées dans l'image constituent un ensemble de pixels que nous identifions comme appartenant à un objet sémantique que nous nommons « la grille ». C'est du moins la définition que nous avons adoptée dans l'approche spatiale. Si nous adoptons le point de vue de l'approche fréquentielle, alors **la grille dans l'image peut être vue comme un phénomène périodique**. Plus particulièrement, elle observe une périodicité horizontale pour les barreaux verticaux et verticale pour les barreaux horizontaux. Mais avant d'étudier cet aspect plus en profondeur, nous avons dû **réaliser un prétraitement des images** de manière à éliminer les défauts les plus gênants que sont le bruit électronique et le gradient de luminosité.

i. Traitement initial des images

Avant de tenter d'extraire l'information que nous cherchons, il est nécessaire de corriger certains défauts identifiés précédemment dans le chapitre «Présentation du cas applicatif de ces travaux». En effet, sur les images présentant un fort niveau de bruit, la détection des contours pertinents nécessaires à la mise en œuvre de la transformée de Hough linéaire par exemple sera compromise. Nous pouvons constater également qu'il existe un gradient d'illumination visible sur la majorité des images, qu'il conviendra de traiter de façon adéquate de façon à ne pas compromettre là aussi l'emploi de techniques de seuillage par exemple.

Correction du bruit électronique.

Un bruit électronique est également visible sur un certain nombre d'images (Figure 72). Sa présence est sans doute due à un ajustement excessif du gain par l'opérateur et à l'électronique du système d'acquisition du microscope. Ce bruit doit être retiré préalablement à tout traitement, car il est également un obstacle à la détermination des contours des objets (cellules et grille). C'est aussi une gêne pour les techniques de segmentation des cellules qui auront des difficultés à discerner les frontières des cellules d'avec les bords de la grille. Pour ce faire nous avons choisi d'utiliser le filtrage de Kovesi (Kovesi 1999)

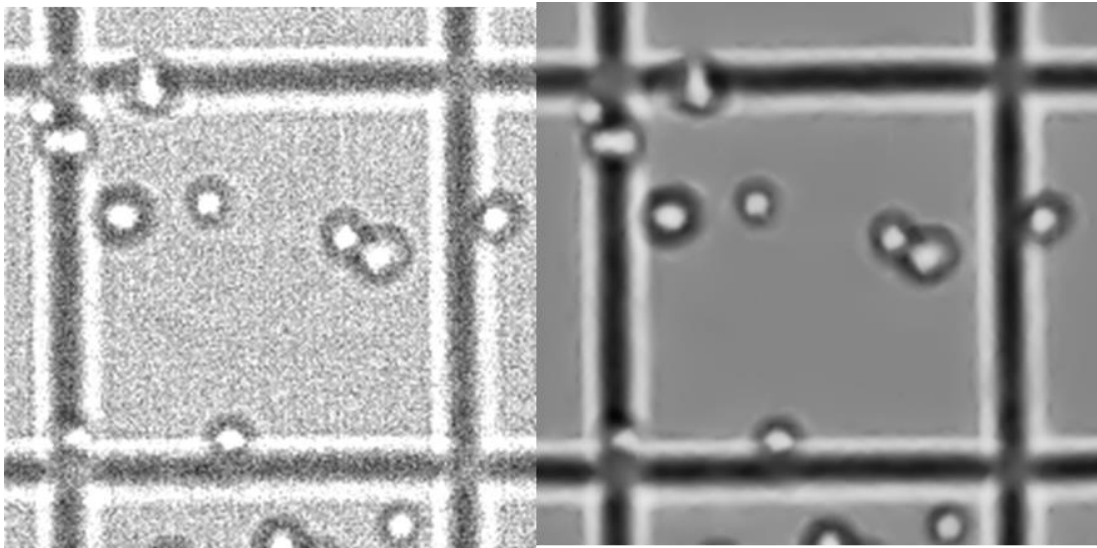


FIGURE 72 ÉLIMINATION DU BRUIT ELECTRONIQUE. A GAUCHE IMAGE PRESENTANT UN BRUIT DE FOND, A DROITE, APRES ELIMINATION DU BRUIT PAR LE FILTRAGE DE KOVESI

Ce filtre réalise une transformation du signal en ondelettes log-Gabor complexes à différentes échelles. Ensuite, le module de la transformée est traité selon la contribution du bruit estimée aux différentes échelles considérées, la phase étant préservée. Souvent dans le traitement d'image par FFT, seule l'amplitude est exploitée. Cependant, la phase doit être prise en compte, car elle contient des informations cruciales sur la structure géométrique de l'image dans le domaine spatial. C'est le point fort de ce filtre. En effet, la phase porte l'essentiel de l'information géométrique concernant les bords et les contours dans l'image, comme le démontre l'expérience présentée Figure 73. L'image de la Figure 73 C a l'amplitude de l'image Figure 73 A (l'église grecque) et la phase de l'image Figure 73 B (Aishwarya Rai), tandis que pour l'image de la Figure 73 D, c'est le contraire. Malgré l'intervention des modules, nous continuons à reconnaître l'image de départ. De ce fait, nous constatons bien que la plupart des informations sémantiques de l'image sont stockées dans la phase. Un traitement dans le domaine des fréquences ne doit pas privilégier le module au détriment de la phase, cette dernière étant capitale pour la reconstruction de l'image originale. C'est une remarque dont il nous faudra tenir compte lors de nos traitements.

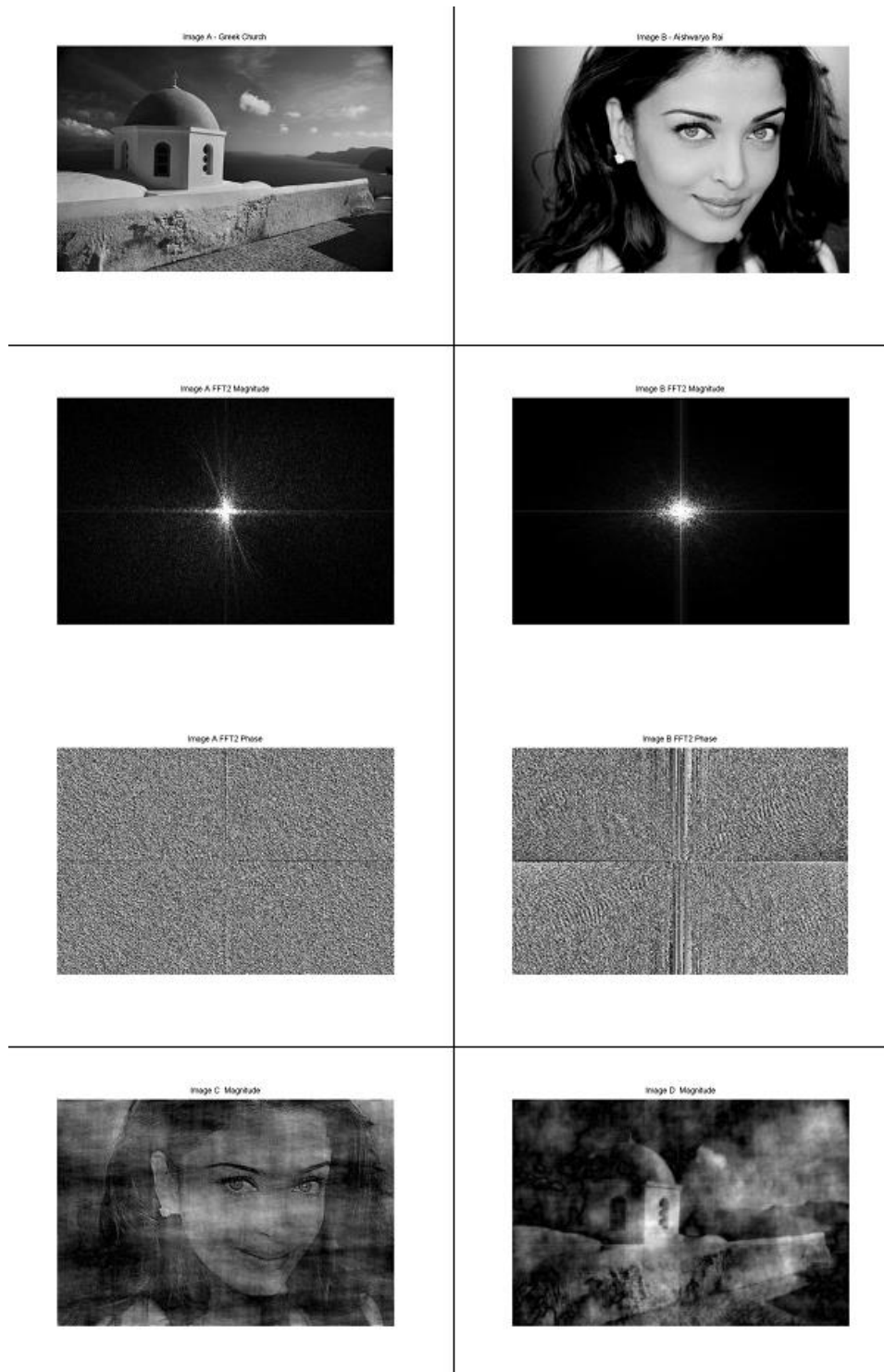


FIGURE 73 EXEMPLE D'IMAGES ET LEURS TRANSFORMEES DE FOURIER 2D : INTERVERSION PHASE-MODULE

Notons qu'il existe d'autres méthodes de filtrage du bruit à base d'ondelettes ou d'analyse statistique (Portilla et al. 2003) qui se comportent bien en ce qui concerne les contours et les bords, mais la méthode de Kovesi (Kovesi 1999) offre un avantage supplémentaire qui est de déterminer automatiquement le seuil à appliquer pour la correction du bruit. L'excellente qualité des résultats et cet automatisme conviennent donc parfaitement à nos besoins et à nos objectifs d'automatisation maximale.

Gradient d'illumination.

Le gradient d'illumination est dû au positionnement de la source d'éclairage du microscope située dans notre expérience en bas à droite du champ d'observation. Cela empêche l'usage d'un seuillage simple comme préalable à la segmentation des cellules ou de la grille comme l'illustre la Figure 74.

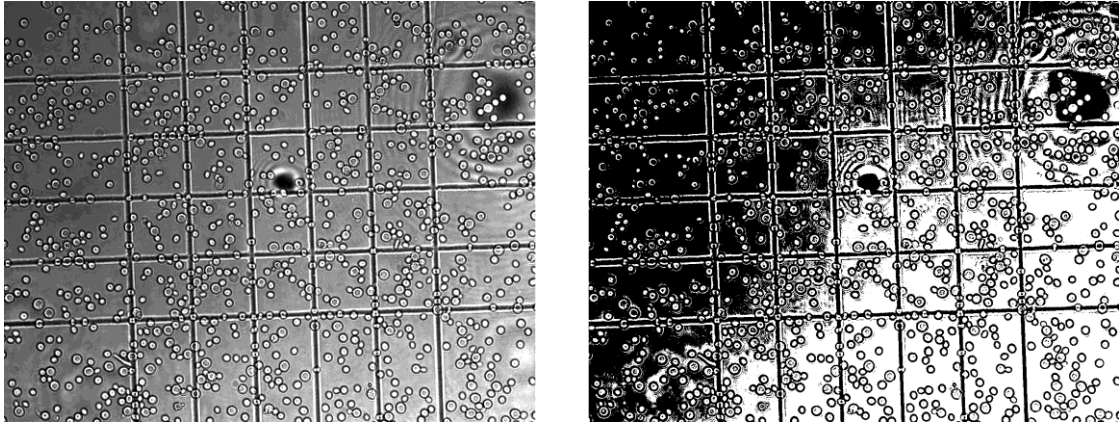


FIGURE 74 A GAUCHE, IMAGE ORIGINALE PRESENTANT UN GRADIENT D'ILLUMINATION ALLANT DU COIN HAUT GAUCHE AU COIN BAS DROIT. À DROITE, LE SEUILLAGE A 50% CORRESPONDANT.

Filtrage homomorphique, principe et application

Le problème de l'illumination peut s'analyser comme suit : les images que l'on perçoit dans la vie courante grâce à nos yeux ou à nos caméras sont la résultante de la lumière issue de la source d'éclairage (l'illumination) et de la lumière réfléchie (la réflectance) par les différents objets inclus dans la scène observée.

Ce que l'on nomme l'illumination d'une image est en général une fonction qui présente de faibles variations tandis que la réflectance est plutôt une fonction qui varie de manière abrupte en particulier au niveau des bordures des objets. Ces observations nous conduisent à associer les basses fréquences à la luminance et les hautes fréquences à la réflectance. Bien que ces associations ne soient qu'approximatives, elles peuvent néanmoins être utilisées pour corriger l'image.

Si une image peut être vue comme une fonction discrète à deux dimensions $f(x, y)$, alors compte tenu des remarques ci-dessus, la nature de $f(x, y)$ peut donc être décomposée en deux composantes:

1. l'illumination $i(x, y)$ qui représente la quantité de lumière incidente qui illumine la scène en question.
2. La réflectance $r(x, y)$ qui représente la quantité de lumière réfléchie par les objets de la scène.

L'image $f(x, y)$ peut donc être modélisée par le produit de l'illumination et de la réflectance suivant l'équation:

ÉQUATION 7

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

où

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

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

La nature de $i(x, y)$ est déterminée par les sources lumineuses (naturelles ou artificielles) tandis que celle de $r(x, y)$ est déterminée par les caractéristiques photométriques intrinsèques des objets de la scène. Nous utiliserons cette modélisation pour améliorer l'apparence de l'image.

Telle quelle, l'Équation 7 ne permet pas de réaliser un traitement séparé sur l'illumination et la réflectance. En effet, la transformée de Fourier de f correspondant à la convolution des transformées de Fourier respectives de i et de r , un filtrage linéaire simple ne peut être réalisé. Afin de contourner ce problème, nous allons considérer le logarithme de la fonction (Équation 8).

ÉQUATION 8

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

La fonction $z(x, y)$ étant constituée d'une somme de deux fonctions, il est maintenant possible d'utiliser la propriété de linéarité de la transformée de Fourier (Équation 9):

ÉQUATION 9

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

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

où $I(u, v)$ et $R(u, v)$ sont respectivement les transformées de Fourier de $\ln(i(x, y))$ et de $\ln(r(x, y))$. Il est alors possible de filtrer la fonction $Z(u, v)$ en la multipliant par une fonction $H(u, v)$ adaptée aux besoins, ce qui donne l'Équation 10 :

ÉQUATION 10

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

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

Si nous notons \hat{f} la transformée de Fourier inverse, le résultat du filtrage de $z(x, y)$ sera noté $s(u, v)$ et sera égal à Équation 11 :

ÉQUATION 11

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

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

Étant donné que $z(x, y)$ avait été obtenue en calculant le logarithme népérien de $f(x, y)$, l'opération inverse va nous fournir l'image filtrée $g(x, y)$ (Équation 12):

ÉQUATION 12

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

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

Moyennant les notations (Équation 13),

ÉQUATION 13

$$i'(x, y) = e^{i\hat{F}(H(u, v)I(u, v))} \text{ et } r'(x, y) = e^{i\hat{F}(H(u, v)R(u, v))}$$

qui sont respectivement l'illumination et la réflectance de l'image corrigée on obtient l'Équation 14:

ÉQUATION 14

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

Pour résumer, le principe du filtrage homomorphique est représenté schématiquement Figure 75.

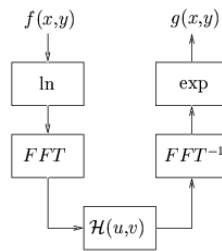


FIGURE 75 SCHEMA DU FILTRAGE HOMOMORPHIQUE

Les spécifications du filtre homomorphique $H(u, v)$ sont alors établies de telle sorte qu'il affecte différemment les hautes et les basses fréquences. La Figure 76 montre la coupe radiale d'un exemple de filtre homomorphique qui peut être utilisé. Pour notre application, l'atténuation des basses fréquences va faire diminuer la dynamique de l'illumination tandis que l'amplification des hautes fréquences va augmenter la réflectance et le contraste de l'image.

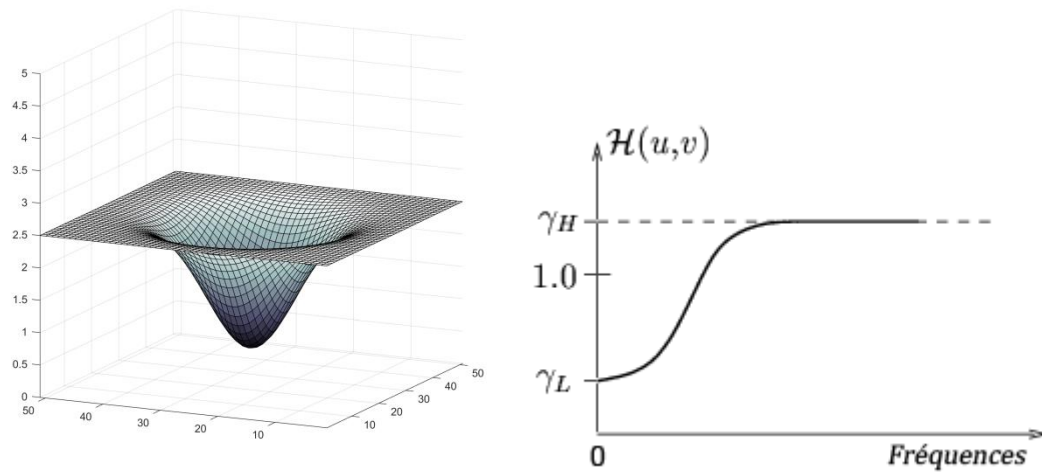


FIGURE 76 UN FILTRE HOMOMORPHIQUE, A GAUCHE SA REPRESENTATION 3D, A DROITE UNE COUPE RADIALE AVEC γ_L LE COEFFICIENT D'ATTENUATION POUR LES BASSES FREQUENCES ET γ_H LE COEFFICIENT D'AUGMENTATION POUR LES HAUTES FREQUENCES,

Le résultat de l'application du filtre homomorphique est montré à gauche Figure 77. Le gradient de luminosité qui s'étendait du sombre dans le coin haut gauche vers le plus clair dans le coin bas droit a été corrigé et le seuillage donne à présent un résultat correct. Nous appliquerons donc ce traitement préalable à toute la série d'images.

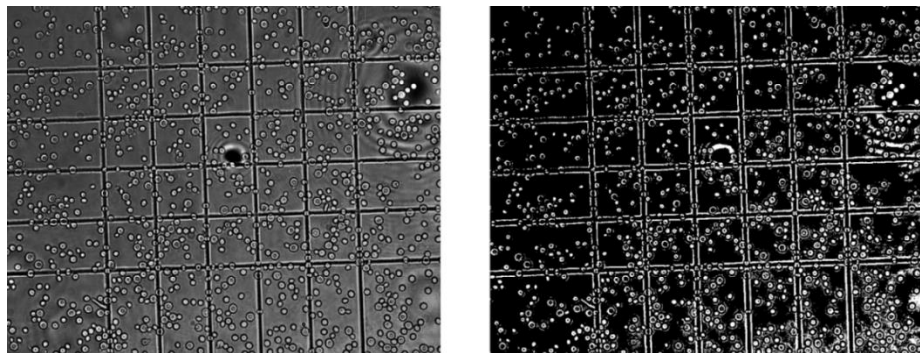


FIGURE 77 IMAGE TRAITEE AVEC LE FILTRE HOMOMORPHIQUE. À GAUCHE, IMAGE ORIGINALE. À DROITE, RESULTAT DU SEUILLAGE A 50% DE L'IMAGE DE GAUCHE.

ii. L'approche fréquentielle

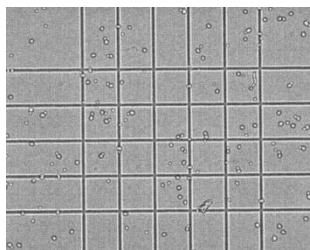
Nous choisissons de travailler dans le domaine fréquentiel par transposition de l'image via une DFT 2D (Cooley et Tukey 1965). La grille et sa périodicité tant horizontale que verticale doivent laisser des « traces » visibles et orthogonales dans le domaine des fréquences. Les cellules, elles, ne représentent pas des phénomènes périodiques et sont distribuées aléatoirement sur l'image, elles ne doivent donc pas laisser de signatures remarquables dans l'espace des fréquences. Partant de ce constat, nous pouvons nous attendre à trouver la signature de cette double périodicité sur les axes horizontaux et

verticaux dans l'espace fréquentiel à l'aide d'une DFT 2D. Pour identifier la signature de la grille, nous utiliserons donc la transformée de Hough linéaire dans l'espace des fréquences pour identifier des alignements de valeurs remarquables.

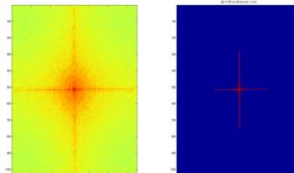
Une fois la trace de la grille localisée dans l'espace des fréquences, nous procéderons à une reconstruction de cette grille par une DFT 2D inverse. Sur cette image reconstruite nous appliquerons un certain nombre d'opérations morpho-mathématiques, puis nous appliquerons une nouvelle fois la transformée de Hough linéaire pour identifier chaque barreau de manière précise.

Ces étapes peuvent se résumer ainsi :

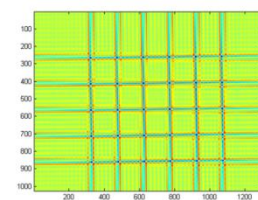
1. Transposition de l'image dans l'espace des fréquences via une transformée de Fourier discrète 2D, voir la Figure 78 A, B.
2. Recherche de la signature de la grille dans l'espace des fréquences via une transformée de Hough linéaire **dans l'espace des fréquences**, voir la Figure 78 B.
3. Extraction de la signature et reconstruction de la grille via une transformée de Fourier 2D inverse de la signature isolée à l'étape précédente, voir la Figure 78 C, D.
4. Seconde transformée de Hough linéaire sur l'image générée pour identifier les barreaux et leurs positions, voir la Figure 78E,F.
5. Effacement de la grille dans l'espace image, méthode présentée dans le chapitre suivant et (E. Denimal et al. 2015)



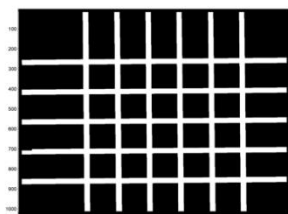
A



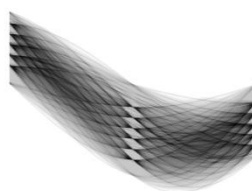
B



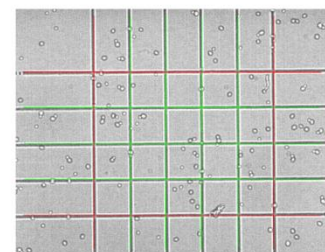
C



D



E



F

6.

FIGURE 78 SCHEMA DE PRINCIPE DE LA DETECTION DE LA GRILLE. (A) IMAGE SOURCE, (B) FFT ET SIGNATURE FREQUENTIELLE DE LA GRILLE, (C) RECONSTRUCTION DE LA GRILLE D'APRES LA SIGNATURE, (D) GRILLE "PROPRE", (E) DETECTION DES LIGNES VIA TRANSFORMEE DE HOUGH, (F) L'OBJET GRILLE POSITIONNE SUR L'IMAGE SOURCE.

Nous retrouvons ces étapes détaillées dans (Marin et al. 2014) pour ce qui est de la détection et dans (E. Denimal et al. 2015) pour ce qui est de l'effacement.

iii. Article 1 Détection de la grille.

Le lecteur trouvera ci-dessous la reproduction de l'article (Marin et al. 2014) tel que publié dans « Microscopy and Microanalysis » constituant le premier élément de ma contribution en tant que second auteur. Cet article décrit en détail le principe de détection de la grille par l'approche fréquentielle. Il présente les résultats obtenus en termes de qualité de positionnement et de caractérisation de la grille ainsi qu'une ébauche de comptage de cellules.

A Robust Generic Method for Grid Detection in White Light Microscopy Malassez Blade Images in the Context of Cell Counting

Ambroise Marin,^{1,2,*} Emmanuel Denimal,^{1,2} Stéphane Guyot,³ Ludovic Journaux,^{2,4} and Paul Molin^{2,3}

¹Service Systèmes d'Information, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

²Groupe Modélisation Numérique en Agronomie et AgroAlimentaire, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

³UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon / Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

⁴Laboratoire Electronique, Informatique et Image, Université de Bourgogne, UFR Sciences et Techniques, allée Alain Savary, 21000 Dijon, France

Abstract: In biology, cell counting is a primary measurement and it is usually performed manually using hemocytometers such as Malassez blades. This work is tedious and can be automated using image processing. An algorithm based on Fourier transform filtering and the Hough transform was developed for Malassez blade grid extraction. This facilitates cell segmentation and counting within the grid. For the present work, a set of 137 images with high variability was processed. Grids were accurately detected in 98% of these images.

Key words: Malassez, Fourier transform, Hough transform, morphological mathematics, cell segmentation, image analysis

INTRODUCTION

In biology, cell counting is a primary measurement. In the context of microscopy research, the Malassez blade is used in the eyepiece of a microscope to determine cell concentration (Hibar, 2007). The volume of solution is calibrated in the Malassez counting chamber, enabling an extrapolation of the number of observed cells in terms of cell concentration in the whole solution. In other words, since grid dimensions are well known, cells counted within the grid directly determine cell concentration in the solution. Hence, precise grid detection allows the determination of a region of interest (ROI) without previous knowledge of image acquisition parameters such as magnification or field of view.

The counting operation is quite tedious, and in recent years, the evolution of numerical devices associated with microscopes has made it possible to automate cell counting by means of image acquisition and processing. In this application, certain industrial devices work well for a standardized series of acquisitions and can be used successfully in cell counting. Nevertheless, in the research laboratory environment, high variability in experimental conditions makes computer image processing less successful. For example, when one uses solutes in the culture medium, the added solute may change the diffraction properties of the medium, thus rendering the image unusable for computer processing. Unfortunately, a serious limitation is linked to the presence of the Malassez grid of the

counting chamber, which may be an obstacle to counting because cells may be confused with the grid by the image processing algorithms, such as thresholding or other segmentation methods. As a result, the presence of the grid in a processed image can lead to false cell detection.

In this context, several attempts to design an automated method to identify and remove the Malassez grid have been undertaken. Chen (2011) proposed a solution based on morphological mathematics which finds a grid and counts cells within it. We tried this algorithm on images from our laboratory. Almost all of the results were unsuccessful due to the high variability and structure in the representation by pixels of the Malassez grid. The algorithm described in Chen (2011) is only able to recognize a grid as a very narrow range of uniform pixel combinations. It also appears that any incomplete grid bars can lead to failure of the algorithm. In fact, when hole filling is processed, if the grid is not perfectly bounded this algorithm fails.

In the present work, we have developed a different approach, essentially based on the fact that a Malassez grid is a regular and doubly periodic shape. We therefore chose the Fourier transform to identify the periods in the image (Cooley, 1965), and the Hough transform (Shapiro, 2001) to identify and reconstruct the grid precisely as a set of straight lines. We then benchmarked this algorithm in order to prove its robustness to perturbations such as noise or defocus and evaluated the quality of detected grids over a set of 137 images. As an application, we counted cells within the detected grid using a method based on threshold and form.

Received July 8, 2014; accepted November 5, 2014

*Corresponding author. Ambroise.marin@agrosupdijon.fr

The result of our work is a very robust algorithm, which is able to recognize and remove the grid from the image without removing the cells intersecting the grid. The method also extracts a ROI based on external lines of the detected grid.

MATERIALS AND METHODS

Biological Materials

Strain and Growth Conditions: The yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171 was used in this study. Yeast cells were maintained in Petri dishes in a modified Malt Wickerham medium supplemented with 20 g/L agar (VWR International, Limonest, France). The modified Malt Wickerham medium was composed of 10 g of glucose (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), 3 g of pancreatic peptone (VWR International), 3 g of yeast extract (Sigma), and 1.5 g of NaH_2PO_4 (VWR International) in 1 L of a water and glycerol solution, which had an osmotic pressure of 1.38 MPa (5.1 g of glycerol/100 g of distilled water; Sigma); the pH was adjusted to 5.35 by the addition of orthophosphoric acid (Sigma). A single yeast colony was introduced into a 250 mL conical flask containing 50 mL of modified Malt Wickerham medium and shaken (250 rpm) for 48 h at 25°C. Then, 100 μL of this culture was poured into two 250 mL conical flasks (control and stress) containing 50 mL of modified Malt Wickerham medium which had an osmotic pressure of 1.38 MPa. Flasks were shaken (250 rpm) for 24 h at 25°C. Every 24 h yeast cells were harvested, collected by centrifugation ($2,880 \times g$, 25°C, 5 min) and poured into a 250 mL conical flask containing 50 mL of modified Malt Wickerham medium which had an osmotic pressure of either 1.38 MPa (control) or 3 MPa or more (stress).

Osmotic pressure adjustment and measurement of the growth medium: osmotic pressure of the Malt Wickerham medium was adjusted by solubilizing growth medium powders (see Strain and Growth Conditions section) in a binary water/glycerol solution which had a determined osmotic pressure. To obtain binary solutions with different osmotic pressures, the mass of solute (i.e., glycerol) to be added to 1,000 g of distilled water was determined using the Norrish equation (Norrish, 1966). Osmotic pressure was verified with a dew point osmometer (Decagon Devices Inc., Decagon Devices Europe, Dardilly, France).

Acquisition System (Microscope) and Acquisition Methods

Culture of 100 μL (at different levels of osmotic pressure) were sandwiched between a Malassez blade and a coverslip. Samples were observed under the microscope 3 min after preparation in order to allow yeasts to sediment.

Yeast cells were visualized by using an upright microscope (Axioplan 2imaging, Zeiss, Marly le Roi, France) equipped with a black and white camera (AxioCam MR, Zeiss) driven by the AxioVision Rel 4.8.0.0 software (Zeiss).

A $\times 63$ objective was used to observe cells. A total of 137 images were taken in the context of the present work.

Images and Properties

All images in the database have the same dimensions, 1296×1026 pixels, but show a slight variability in spatial resolution. This means that the Malassez grid does not have the exact same scale in resulting images.

Depending on the operator and kind of sample observed, there is a large variability in image illumination (Figs. 1a, 1b) and contrast (Figs. 1b, 1c).

In the course of our experimentation, orientation issues occurred when blades were not correctly positioned under the microscope. This situation resulted from the absence of any locking system of the blade in the microscope (Fig. 1d).

Depending on the kind of solute used, defocusing and reduction in the depth of the field may become recurrent problems (Fig. 1e).

Other disturbances (electric noise, solute contamination, high cell density, etc.) can lead to misrecognition of the grid (Figs. 1f–1h).

Grid Detection

In Malassez images, four distinct kinds of objects are identified: background, grid, cells and in certain cases, artifacts. As a principal object, the grid has a heavy semantic value. In Malassez images, the grid appears as a doubly periodic object; Therefore, using a Fourier transform seems an efficient way to extract it.

First, a two dimensional fast Fourier transform (FFT) was performed on a target image using equation (1) where (k_x, k_y) are the coordinates in the transformed image, N_x and N_y represent the size of the original image and (n_x, n_y) are the coordinates in the image

$$\text{FFT}(k_x, k_y) = \frac{1}{\sqrt{N_x N_y}} \sum_{n_x=0}^{N_x-1} \sum_{n_y=0}^{N_y-1} f(n_x, n_y) e^{-j2\pi \frac{k_x n_x}{N_x}} e^{-j2\pi \frac{k_y n_y}{N_y}}. \quad (1)$$

It is supposed that a periodic object in an image produces an easily identifiable signature in the Fourier projection. In the centered module projection of the FFT, a high energy cross pattern is observed. Observations show that this pattern is centered and its orientation is highly correlated with grid orientation in the image. Therefore, the hypothesis is that this cross pattern is the spectral signature of the grid. This hypothesis was further validated after extraction of this signature.

The second step is the extraction of the grid signature in the FFT projection (Fig. 1b). We wanted to extract the two groups of aligned points which form the cross pattern in the FFT module space. To do this, a threshold was defined empirically at 65% of the maximum of the logarithm of the FFT modules.

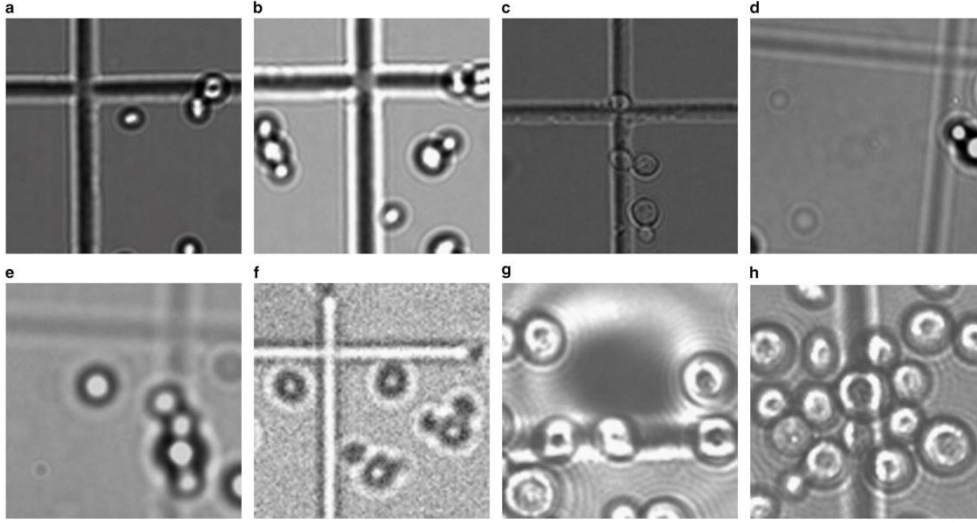


Figure 1. Samples of images showing variability.

To accurately determine the parameters of the two lines forming the cross pattern, the classical Hough line detection method (Shapiro, 2001) appeared to be a solution.

The Hough transform returns a (ρ, θ) parametric space, as shown by equation (2), where x, y are the coordinates in the image and θ varies between -90 and 90° .

$$\rho = x \cos \theta + y \sin \theta. \quad (2)$$

In this space, a specific pixel in the original image produces a sinusoidal curve. This sinusoidal curve represents lines in the original image space that go through this pixel for a set of angles θ ; usually θ varies from -90 to 90° with a 1° step. The intersection of two sinusoids represents the line (ρ_1, θ_1) going through two pixels. Therefore, larger clusters of intersections represent larger collinear groups of pixels.

The ρ and θ parameters of the two lines forming the cross pattern are determined by the two largest clusters in the Hough parametric space (Fig. 2c).

The next step was the extraction of the grid spectral signature from the FFT. Using the two sets of parameters previously determined and the Bresenham algorithm (Bresenham, 1965), a set of frequencies was extracted from the FFT matrix.

In a two dimensional discrete space, the Bresenham algorithm aims at determining points that approximate a line as shown in equation (3)

$$\dot{y} = \left\lceil \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} (\dot{x} - x_1) + y_1 + 0.5 \right\rceil. \quad (3) \text{Bresenham algorithm}$$

$$\dot{x} = \{x \in \mathbb{N} \mid x \geq x_1, x \leq x_2\}$$

In this application (\dot{x}, \dot{y}) , are the discrete coordinates of the FFT matrix cells along the segment going through (x_1, y_1)

and (x_2, y_2) which are the intersections between the lines previously computed with the Hough transform and the FFT matrix boundaries.

An inverse FFT was performed on extracted frequencies. This resulted in an image representing the grid information. This step thus validates the previously formulated hypothesis concerning the meaning of the observed cross pattern.

Precise Fitting of the Grid with Parametric Lines

It was now necessary to find a parametric grid that fits the grid information. The Hough transform is also used for parametric grid retrieval. In its most classic use, the Hough transform is carried out after an edge filtering with, for example, Canny (Shapiro, 2001) or Sobel (Gupta, 2013) operators (Figs. 2a, 2b).

The resulting lines (Fig. 2c) are not centered on a grid bar but rather fit with edges that the operators have found; therefore, the parametric grid does not fit optimally. In addition, spaces between parallel lines of the resultant grid vary; hence, the resulting grid is not regular. Consequently, this result is not usable for further treatments such as statistical analysis or cell concentration measure.

Our next step was to substitute morphological operations for edge detection in the image before using the Hough transform. First, a top hat operator (Serra, 1982) was applied with a disc shaped structural element in order to clear the background. Second, the image was binarized using a 20% threshold, then an opening (Serra, 1982) followed by a dilatation (Serra, 1982) was applied to uniform grid bars. Finally, a skeleton (Serra, 1982) operation was performed to extract

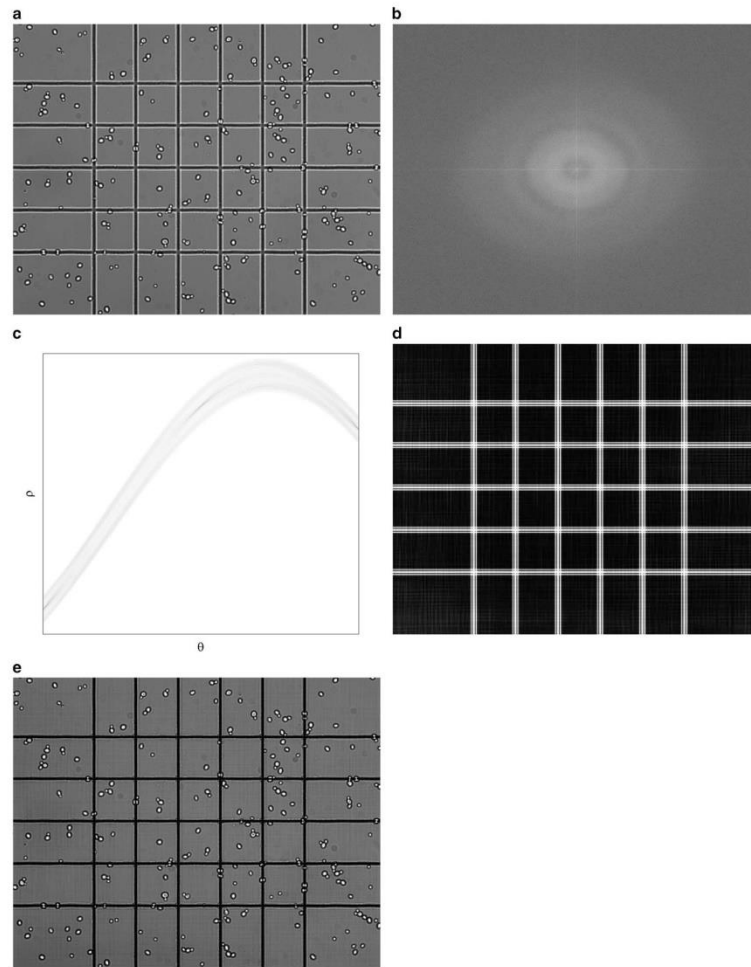


Figure 2. Original image (a), FFT (b), Hough Transform (c), grid information (d), filtered image (e).

pixels from the medium axis of the bars (Fig. 3a). Note that minor artifacts occasionally remain after clearing of the background and can result in non-significant local aberrations within the skeleton. See Figure 3a: the left bar shows an “inverted C” shaped aberration.

Based on this grid skeleton, the Hough transform was performed (Fig. 3b). Resulting lines are centered and the resulting grid is regular (Fig. 3c).

ROI and Cell Segmentation

Based on the previously computed parametric grid, a rectangular area is defined by outer lines. This is the ROI of a

Malassez blade. Cells are counted only within this ROI. The real size of this ROI is known and allows an estimation of the scale of the image.

For cell detection, the grid information previously extracted with the FFT method was subtracted from the original image. In the resulting image, the grid is attenuated and allows the extraction of cells using the Otsu threshold method (Otsu, 1979).

A cleaning step, consisting of an opening morphological operation which aims at removing isolated outlier pixels, was applied.

A shape analysis was then performed. This first consists of a measure of solidity, which is the proportion of pixels that

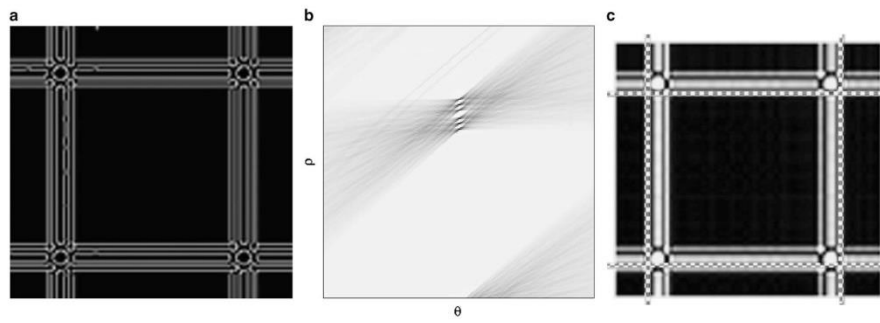


Figure 3. Canny filter (a), Hough transform (b), resultant grid lines (c).

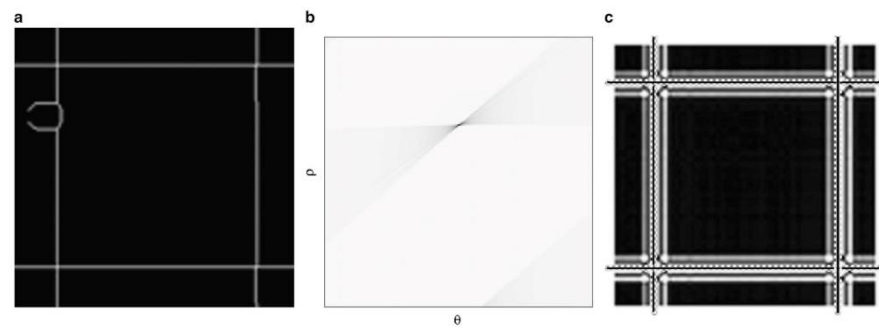


Figure 4. Grid skeleton (a), Hough transform (b), resultant grid lines (c).

belong to the area and its convex hull. In most cases, a cell should be a convex object; hence, if the solidity of the area is $<75\%$, it is eliminated.

Second, a ratio between the minor and major axes of the area is calculated. In the context of the present study, it is assumed that a cell is a roughly circular object, so this ratio should be as close as possible to 1. In fact, cells or cell groups are frequently elongated; experimentally, a limit of 0.66 was chosen for this criterion.

Third, as the size of the cells is known, the estimated scale allows for elimination of objects which are too small. For bigger objects, it is assumed that they may be groups of cells and thus shape factor parameters become more flexible; in fact, they are divided by a factor of 2.

RESULTS

Reference Image Generation

In order to proceed with robustness tests with controlled images, a reference grid was designed. An image characterized by low noise and low cell density, in which the grid was very clear, was selected. The grid orientation was also taken into account, in order to allow for easy averaging. First, a part

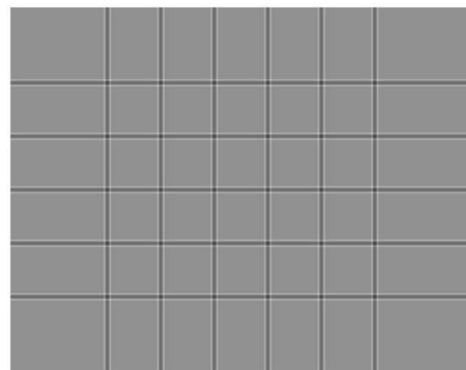


Figure 5. Synthetic grid.

of the grid was sampled. A reference grid profile was obtained by averaging this sample along its axis. Then, this profile was used to generate an empty grid (Fig. 5).

Disturbances, such as noise or contrast variation, were further added to this model in order to generate a set of disturbed images.

Table 1. Correlation of C_v With Actual Grid's Bars Positioning Error.

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

This model was used as a benchmark.

To evaluate grid detection quality, two parameters were then considered. First, the grid ratio between height and width is known; for each retrieved grid, this ratio was computed and expected to be as close as possible to 4/5, which is the real grid ratio. Second, the regularity of the grid was assessed using the relative standard deviation (RSD) of the 20 sub-square areas. This coefficient C_v was determined by equation (4), where μ is the mean and σ the standard deviation:

$$C_v = 100 \frac{\sigma}{\mu}. \quad (4)$$

To facilitate the interpretation of C_v , errors were added in a synthetic grid in order to find a correlation between C_v and a global error in the bar positions of the grid, expressed in pixels. E_c represents the pixel shifting of one central column bar. E_l represents the pixel shift for a central line bar. Global error is expressed by calculating the modulus of the vector (E_c, E_l); see Table 1.

Robustness of the Grid Extraction Method in terms of Scale, Luminosity, Contrast, Orientation, Defocusing and Noise Issues

In order to measure robustness to the scale factor (SF), a synthetic grid was scaled with factors SF 101, 102, 104, 108, 116, and 132% (Table 2).

In order to examine luminosity issues, a set of over and under-exposed synthetic grids was generated using a set of luminosity factors (LF) (1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4), (Table 3).

To test orientation robustness, rotations of 1, 2, 4, 8, 16, and 32° were applied to the synthetic grid (Table 4).

Defocusing was simulated by adding a zero mean Gaussian blur to the synthetic grid. Simulated defocusing

Table 2. Robustness to Scaling Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

SF (%)	C_v	ROI Ratio
100	0	0.800
101	0.5	0.800
102	0	0.800
104	0	0.800
108	0	0.800
116	0	0.800
132	0	0.800

SF, scale factors; ROI, region of interest.

Table 3. Robustness to Luminosity Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

LF	C_v	ROI Ratio
1/32	0	0.800
1/16	0	0.800
1/8	0	0.800
1/4	0	0.800
1/2	0	0.800
1	0	0.800
2	0	0.800
4	0	0.800

LF, luminosity factors; ROI, region of interest.

Table 4. Robustness to Rotation Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

Angle	C_v	ROI Ratio
1	0.39	0.800
2	0.5	0.800
4	0.28	0.800
8	0.91	0.800
16	0.33	0.800
32	0.46	0.799

ROI, region of interest.

Table 5. Robustness to Defocusing Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

Blur Standard	C_v	ROI Ratio
1	0	0.800
2	0	0.800
4	0	0.800
8	0	0.800
16	0.12	0.800

ROI, region of interest.

increases with blur standard deviation, whose chosen values were 1, 2, 4, 8, and 16 (Table 5).

A factor C was used in order to adjust the contrast. Input values between zero and one were mapped between C and 1-C. Note that |C| should not exceed 0.5, which results in a uniform gray image (zero contrast) (Table 6).

Table 6. Robustness to Contrast Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

C	C_v	ROI Ratio
-0.35	0	0.800
-0.25	0	0.800
-0.15	0	0.800
-0.05	0	0.800
0	0	0.800
0.05	0	0.800
0.15	0	0.800
0.25	0	0.800
0.35	0	0.800

ROI, region of interest.

Table 7. Robustness to Noise Issues, Measured by C_v and ROI Ratio.

Noise Standard	C_v	ROI Ratio
0	0	0.800
0.01	0	0.800
0.02	0	0.800
0.04	0	0.800
0.08	0	0.800
0.16	0.45	0.800
0.32	0	0.800
0.64	0.32	0.798
1.28	1.94	0.796
2.56	2.29	0.793

ROI, region of interest.

Finally, for evaluation of noise robustness, a zero mean Gaussian noise was added to a synthetic grid with the following standard deviations: 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, and 2.56 (Table 7).

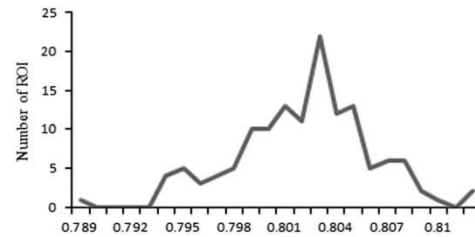
Results of ROI and Grid Extraction

Two of the 137 images were eliminated because the grid was not entirely visible, so the results were not relevant.

For the 135 images in which the grid was complete, a ROI was detected in every case. The RSD of the ROI ratio never exceeded 1.54% and was <0.7% in 107 out of the 135 images. The average RSD was 0.45%. In fact, 0.7% represents a one pixel error on grid bar positioning; as a perfect positioning of the ROI may not match with the pixel matrix, a ROI of <0.7% error is considered to be very well positioned. An error of 1.4% signifies a two pixel error.

When the distribution of the ROI ratio over the sample of 135 images was traced, we observed that statistically the target ROI ratio was 0.803 (see Fig. 6). This shifting can be explained by standard tolerances in the Malassez grid building process.

Figure 7 presents an example of an image with its detected ROI.

**Figure 6.** Distribution of region of interest (ROI) ratio.

For the 135 selected images in our sample, the RSD of 40 grids was <1%; 94 grids were below 2% and 132 grids were below 5%. In the three remaining images, the C_v was over 12%. This indicates that the algorithm failed to find at least one bar of the grid for these images (Figs. 8, 9).

Figure 10 presents an example of an image with its detected grid.

Results of Cell Segmentation and Cell Counting

An Otsu threshold was applied and following this, a standard set of parameters was determined for cell segmentation: minimum and maximum target cell sizes were set at 3 and $25 \mu\text{m}^2$, respectively. The solidity parameter was set at 75% for clusters in target sizes and at 37.5% for bigger clusters. The ratio parameter was set at 2/3 for clusters in the target size and 1/3 for bigger ones. Five images with noise, focus, contrast, illuminant and grid orientation issues were selected as examples of resulting cell segmentation with standard parameters (Figs. 11–15). Table 8 sums up the manual and automatic cell counts for these five images with the percentages of difference between them (Δ).

DISCUSSION

Robustness tests show that our method for grid extraction is not affected by scale, light, contrast, or focus issues. These tests show that a very strong noise can induce a RSD of grid bar positioning of up to 2%, which represents ~5 pixels of cumulated error in positioning for the grid bars. As real cases never present such a noise level, we may thus consider that the method is not sensitive to noise issues. The rotation test induced a RSD of up to 0.9%, which represents ~2 pixels of cumulated error in positioning for the grid bars. In fact, as this induced error is not correlated with angle value, we assume that it is due to the discretization of the grid and thus consider that the method is not affected by rotation issues.

In images that present a highly contrasted grid, subtracting grid information allows for the separation of cells with a threshold method. It was observed that, in cases of low contrast grids, extracted information intensity is low; hence, its removal from the original image does not really impact threshold quality. In this case, cell segmentation relies mainly on morphological and form factor methods.

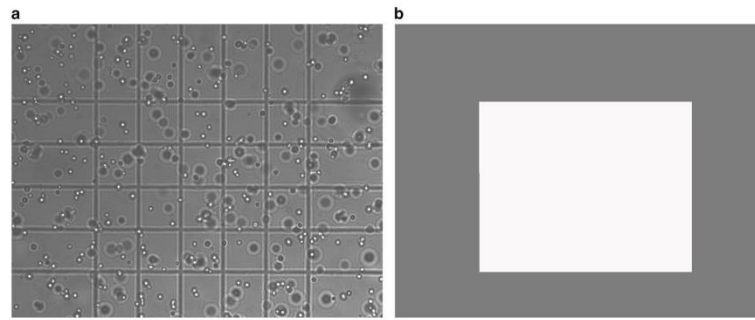


Figure 7. Initial blade image (a) and detected region of interest (ROI) (b).

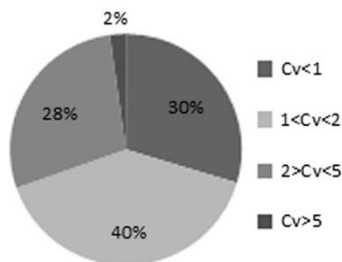


Figure 8. Relative standard deviation for 135 images sample.

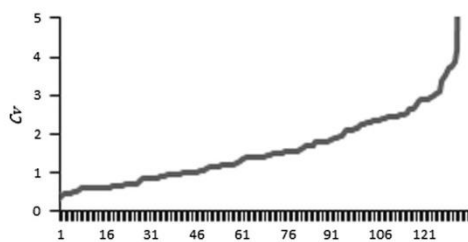


Figure 9. C_v values for 135 images sample, images sorted by increasing C_v .

A standard set of parameters was empirically determined for morphological and form factor phases. The results are acceptable, but can be optimized by fine-tuning parameters depending on input image quality and expected cell sizes.

CONCLUSIONS

Here we propose a robust method for grid extraction based on Fourier and Hough transforms. We applied this method to a set of 137 Malassez images. In our 137-picture sample, which shows extreme variability, our method was able to detect a correct ROI for all images, except for two in which the grid was not complete. For the 135 images in which a ROI was detected, our method produced a complete grid with a good RSD in almost all cases. Nevertheless, in three images, our method failed to find at least one bar of the grid ($RSD > 10$), however it found a good ROI as exterior lines were correctly detected.

We then used raw grid information in order to facilitate cell segmentation using the Otsu threshold method and demonstrated the possibility of obtaining good quality cell segmentation in almost all images in our set. This, however, depends on individual fine tuning of post threshold shape analysis. Nevertheless, the threshold method for cell

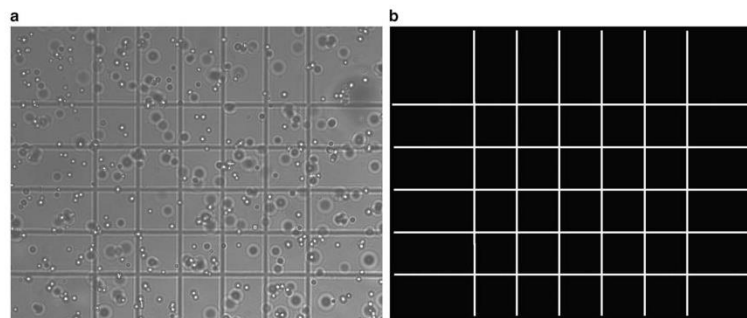


Figure 10. Initial image (a) and detected grid (b) with $C_v = 0.9$.

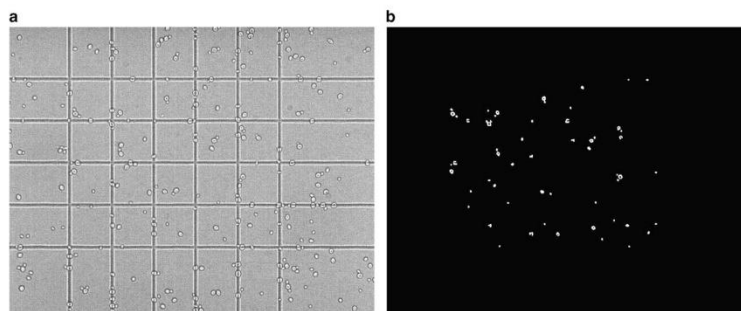


Figure 11. Noisy and low contrast image (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

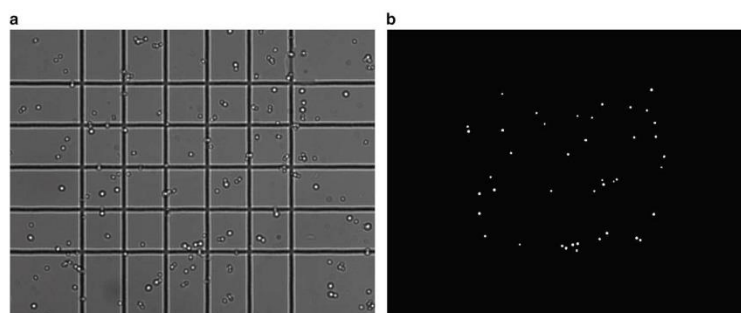


Figure 12. High contrast image (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

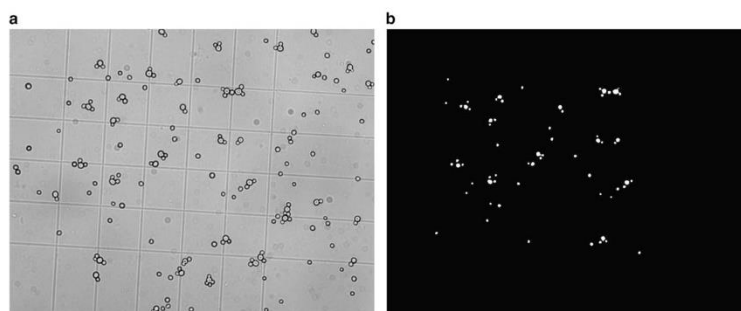


Figure 13. Image with rotation issue, measured about 3° clockwise (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

extraction presents certain drawbacks, for example it is highly noise sensitive and it does not work well with dark objects. Otsu-based segmentation results are core or ring shaped cells, which can cause problems in terms of counting by inducing double detection. Cell segmentation using the Otsu threshold also performs poorly with aggregated cells, which are considered as a single object, inducing a logical failure at the shape analysis stage. In fact, this problem can be

solved by using watershed methods. We further plan to concentrate on improving grid extraction quality, especially in case of rotation, by trying to suppress artifacts generated after Fourier transform filtering.

In the research reported here, we focused on grid extraction, not on cell segmentation and counting. We now plan to improve cell segmentation quality by substituting circular Hough transform or frequency-based methods for

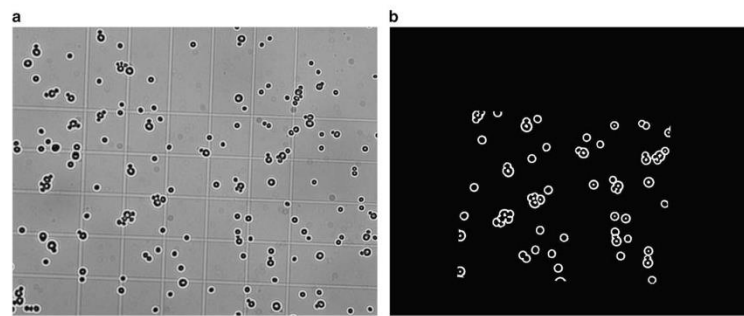


Figure 14. Image with luminosity issue and “black” cells (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

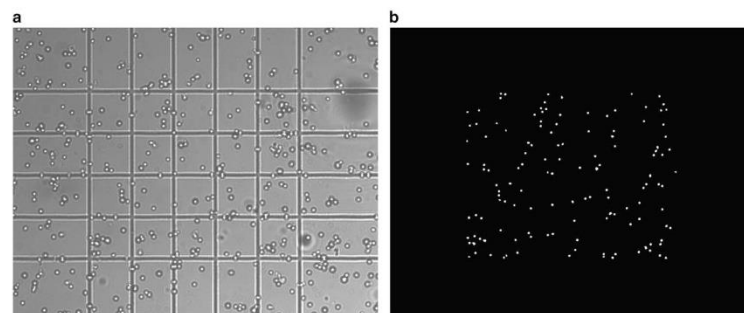


Figure 15. Defocused image (a) and detected cells within region of interest (ROI) (b).

Table 8. Relative Errors Between Manual and Automatic Counts.

	Manual Count	Automatic Count	Δ (%)
Image 1	54	60	10
Image 2	42	52	19.2
Image 3	61	63	3.2
Image 4	62	58	6.9
Image 5	131	141	7.1

the Otsu threshold method, and cell counting by using watershed methods or an intelligent combination of these three methods.

Finally, our ultimate aim is to provide a fully automatic image analysis tool for cell extraction and counting in generic hemocytometer microscopy images.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Jean-Marie Perrier Cornet and Laurence Dumas for promoting the development of this work, and to the DSI/CCUB staff of the Burgundy university for the help on Matlab® software use.

REFERENCES

- BRESENHAM, J.E. (1965). Algorithm for computer control of a digital plotter. *IBM Syst J* **4**(1), 25–30.
- CHEN, Y.W. & CHIANG, P.-J. (2011). Automatic cell counting for hemocytometers through image processing. *World Acad Sci Eng Technol* **5**.
- COOLEY, J.W. & TUKEY, J.W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex fourier series. *Math Computation* **19**, 297–301.
- GUPTA, S. & MAZUMDAR, S.G. (2013). Sobel edge detection algorithm. *Int J Comp Sci Manag Res* **2**(2), 1578–1583.
- HIBAR, K., DAAMI-REMADI, M., AYED, F. & EL MAHJOUR, M. (2007). Fusarium crown and root rot of tomato and its chemical control. *Int J Agric Res* **2**.
- NORRISH, R.S. (1966). An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *J Food Technol* **1**, 25–39.
- OTSU, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica* **11**, 23–27.
- SERRA, J. (1982). *Image analysis and mathematical morphology*, v. 1. Academic press.
- SHAPIRO, L., STOCKMAN, G.C. (2001). *Computer Vision*. 2001. ed: Prentice Hall.

c. Avantage de l'approche fréquentielle dans le positionnement de la grille.

Les résultats présentés dans ces deux articles peuvent être comparés à ceux obtenus dans le chapitre de l'approche spatiale (page 91).

Nous constatons que l'approche fréquentielle est plus précise concernant le positionnement de la grille. Pour valider ce résultat, nous avons comparé statistiquement les mesures image par image et réalisé par un test de conformité de Student sur la série des différences. La moyenne des différences (-0.75) apparaît très hautement significative ($ddl=134$, $pvalue < 10^{-6}$). De par sa nature fréquentielle, elle est également plus robuste, car elle est tolérante aux perturbations de type bruit électronique, rotation, flou, comme nous le montrons dans l'article (Marin et al. 2014) et, un plus grand nombre de grilles ont pu être positionnées dans les images (137 contre 134 Figure 79).

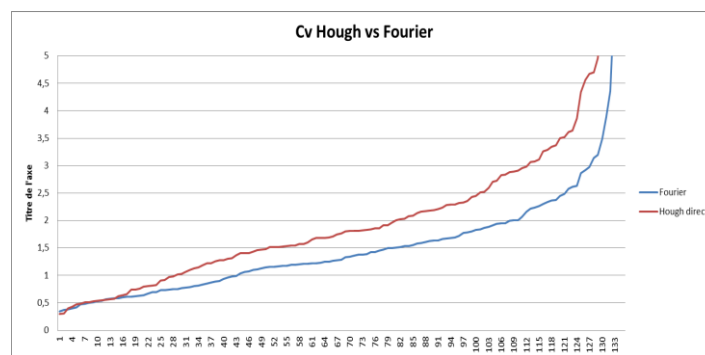


FIGURE 79 COMPARATIF DE LA PRECISION DU POSITIONNEMENT DES BARREAUX ENTRE L'APPROCHE SPATIALE (HOUGH DIRECT) ET L'APPROCHE FREQUENTIELLE (FOURIER)

Un des points remarquables concernant la qualité de la détection de la grille est que nous avons pu établir dans (E. Denimal et al. 2015) qu'elle était suffisante pour déterminer la marque du fabricant des lames de comptage. Nous avons découvert que le ratio Hauteur/Largeur des grilles étudié n'était pas de 0.800 comme attendu théoriquement, mais de 0.803. Cette différence semble très faible, mais elle est très hautement significative compte tenu de l'écart type des mesures, voir la Figure 80.

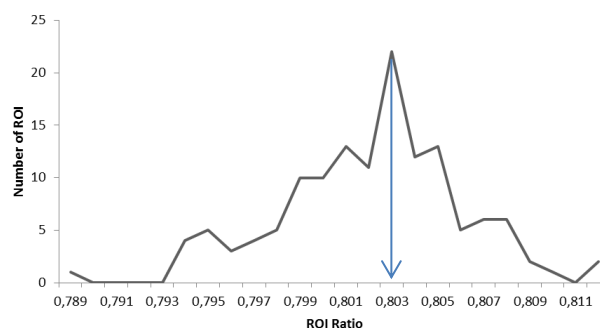


FIGURE 80 REPARTITION DU RATIO DE LA R.O.I. POUR LES IMAGES ANALYSEES.

Nous avons analysé différentes grilles produites par différents fournisseurs et nous avons constaté qu'il y avait un biais dans la R.O.I. selon les fabricants. (Figure 81)

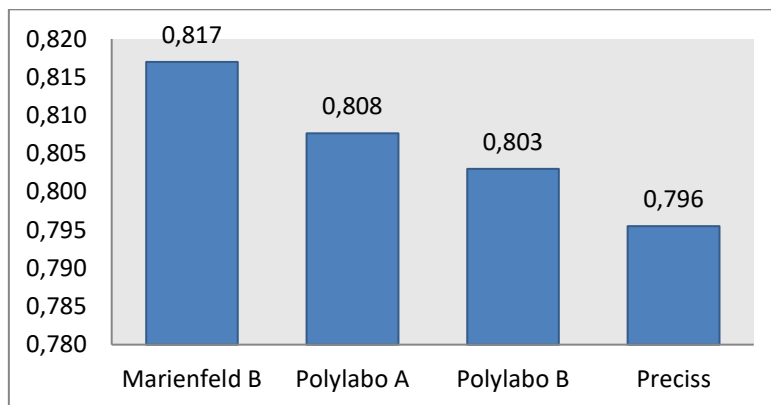


FIGURE 81 RATIO DE LA R.O.I. SELON LA MARQUE DU FABRICANT DE LA LAME DE COMPTAGE.

Cela n'apporte pas une information de grande valeur, mais cela atteste que notre méthode est suffisamment précise pour identifier le fournisseur de la lame de Malassez utilisé.

2. L'effacement de la grille dans le domaine fréquentiel.

a. Pourquoi vouloir effacer la grille ?

La grille est un outil nécessaire de calibration. Elle sert de guide au comptage manuel et garantit que l'opérateur dénombre les cellules dans un volume de solution parfaitement déterminé. Cependant comme nous l'avons constaté lors de l'analyse de la technique de Chen et Chiang (Chen et Chiang 2011) en particulier, si effacer la grille dans le domaine spatial permet une segmentation des cellules plus simple de laquelle découlera le dénombrement, elle a l'inconvénient de fractionner les cellules à cheval sur un barreau de grille et/ou de laisser des traces résiduelles qui peuvent être comptées comme des cellules (Figure 61).

Précédemment, nous avons montré que nous étions capables d'extraire des images l'information sémantique de la grille. Nous avons récupéré sa géométrie et son positionnement précis. Nous avons dès lors pu établir la R.O.I. à l'intérieur de laquelle le comptage devait avoir lieu.

À ce point de l'étude, la grille devient un artefact embarrassant pour les techniques de segmentation préalable au comptage des cellules. Pour qu'elles puissent être efficaces, il est nécessaire de leur soumettre des images où dans la mesure du possible, ne figurent que les objets pertinents à segmenter.

b. Article 2 : Effacement de la grille

Dans l'article (E. Denimal et al. 2015) reproduit dans les pages suivantes, nous présentons une technique pour améliorer le positionnement de la grille et pour effacer la grille à partir du domaine fréquentiel. Nous nous attachons dans un premier temps à optimiser le positionnement de la grille en optimisant le rapport signal/bruit de la signature de la grille et en minimisant les effets de bordure liés à la FFT 2D. Puis dans un second temps, la signature de la grille ayant été identifiée, nous présentons une technique pour l'effacer avec un minimum de nuisances sur l'image résultante.

Cet article qui a été publié en tant que premier auteur constitue le second élément de ma contribution.

Reliable Detection and Smart Deletion of Malassez Counting Chamber Grid in Microscopic White Light Images for Microbiological Applications

Emmanuel Denimal,^{1,2,*} Ambroise Marin,^{1,2} Stéphane Guyot,³ Ludovic Journaux,^{2,4} and Paul Molin^{2,3}

¹Service Systèmes d'Information, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

²Groupe Modélisation Numérique en Agronomie et AgroAlimentaire, AgroSup Dijon, 26 boulevard Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

³UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

⁴Laboratoire Electronique, Informatique et Image, Université de Bourgogne, UFR Sciences et Techniques allée Alain Savary, 21000 Dijon, France

Abstract: In biology, hemocytometers such as Malassez slides are widely used and are effective tools for counting cells manually. In a previous work, a robust algorithm was developed for grid extraction in Malassez slide images. This algorithm was evaluated on a set of 135 images and grids were accurately detected in most cases, but there remained failures for the most difficult images. In this work, we present an optimization of this algorithm that allows for 100% grid detection and a 25% improvement in grid positioning accuracy. These improvements make the algorithm fully reliable for grid detection. This optimization also allows complete erasing of the grid without altering the cells, which eases their segmentation.

Key words: Malassez, Fourier transform, noise filtering, homomorphic filtering, image analysis

INTRODUCTION

Recent progress has made automation of cell counting possible. However, it must be pointed out that from 2010 to 2014 >400 papers described the use of Malassez counting chambers (or hemocytometers) to estimate cell concentration. Different fields of biology were concerned, including microbiology (Philippe et al., 2014), hematology (Bargougui et al., 2013), cancer biology (Valque et al., 2012), and marine biology (Mai et al., 2013). Such an observation suggests that we still need semi-automated cell counting using a Malassez (or Thoma) chamber. The word “semi” is justified by the need to take some photos of biological cells spread on a Malassez chamber placed under a microscope. The word “automation” relates to the use of an algorithm and software to routinely analyze cells and measure the concentration, size, shape, and homogeneity of cell distribution. In a recent work, we presented a method for grid detection in Malassez slide images under white light microscopy (Marin et al., 2014). This method successfully found the region of interest (ROI) bounded by the external bars of the grid in 97.8% of the 135 images, but failed at finding at least one bar of the grid for the remaining images. In that previous work, we showed the robustness of this method. Nevertheless, homogeneity of background luminosity and noise issues can affect the precision of grid bar positioning. Hence, we added a homomorphic filter (Williams &

Madisetti, 1997) and a noise filter step (Kovesi, 1999). We later found that low contrast can induce problems in cross-pattern detection in frequency space which appeared as the main explanation for the method failure in 2.2% of the images. Therefore, we worked on improving grid detection by acting on image contrast and on enhancement of cross-pattern detection in frequency space. We present here this improved grid detection method. We also present an improved grid deletion method that allows better segmentation of cells for further processing. By suppressing all cases of failure, these improvements make our method fully reliable.

MATERIALS AND METHODS

First, we calculate the peak signal-to-noise ratio of the image and if it exceeds a threshold set empirically, we treat the noise using a filter developed by Kovesi (1999). Figure 1 shows an example of a filtered picture by this algorithm. This filter relies on nonorthogonal, complex valued, log-Gabor wavelets, and preserves phase. Second, as a brightness gradient can be observed in some images, image luminosity is normalized by applying a homomorphic filter (Voicu et al., 1997; Williams & Madisetti, 1997). The principle of homomorphic filtering is to remove high frequency (considered as reflectance) and keep low-frequency (considered as luminance). The background is thus suppressed by low-pass filtering of the image logarithm and by taking the exponential to restore the image (Williams & Madisetti, 1997) (Fig. 2).

Received March 18, 2015; accepted April 29, 2015

*Corresponding author. emmanuel.denimal@agrosupdijon.fr

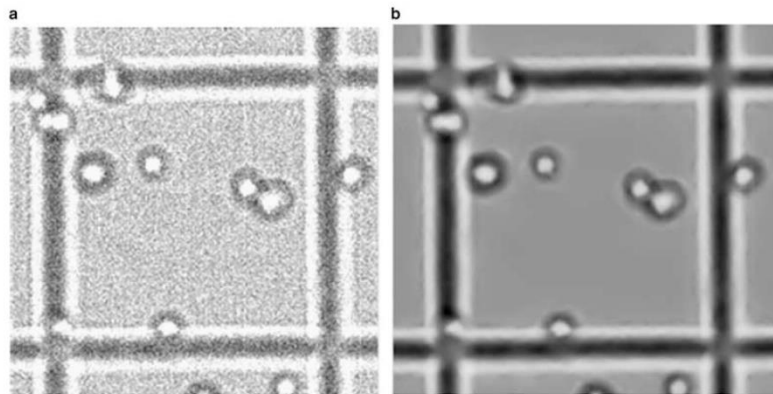


Figure 1. (a): Original picture, (b) filtered picture.

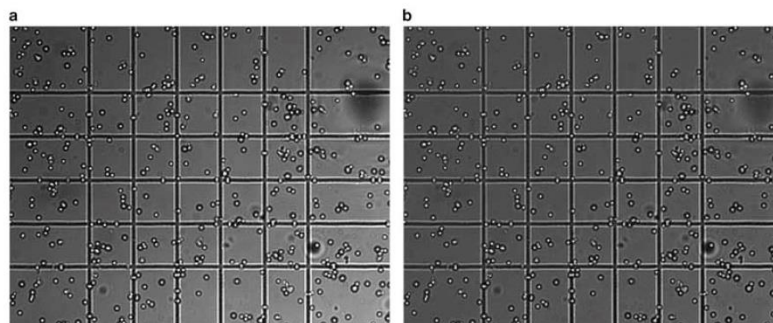


Figure 2. (a): Original picture, (b) picture after application of homomorphic filter.

IMPROVED DETECTION

We investigated the failures and realized that in the case of rotation problems, applying the two-dimensional fast Fourier transform (2D FFT) algorithm directly on the image generates a cross-pattern artefact due to sharp discontinuities at the boundaries of the four image blocks (Williams & Madisetti, 1997) (Fig. 3). This artefact can be confounded in frequency space with the cross pattern we are looking for; hence, it explains failures. In order to deal with this problem, images are windowed and smoothly faded to zero using a centered sinusoidal mask. The grid information is located in the center of the image so that the process does not affect it.

When the grid contrast is low, the cross pattern we are looking for in the FFT can be masked by other frequency information. A second 2D FFT is computed, based on an image with enhanced contrast. As shown in Figure 4, the cross pattern appears more clearly, which allows for improved detection.

IMPROVED DELETION

In our previous work (Marin et al., 2014) we extracted the absolute value of the grid signal and we subtracted it from the original image in order to facilitate segmentation methods based on thresholds. This subtraction has two major drawbacks: first, there remains a strong black imprint of the grid. With some types of dark cells, this causes problems for the subsequent segmentation method based on a threshold. Second, the cells that intercept the grid are degraded by this operation. In most cases cells are divided into two parts, which may lead to false positives in detection of the cells. One of the main proposed improvements is deletion of the grid in the original image without altering cells that intercept bars. This deletion is performed by splitting the grid signal into a positive and a negative part, which represent bright and dark parts, respectively, of the grid (Fig. 5). Then the bright part of the grid signal is subtracted and the dark part of the grid signal is added to the image. It results in an image with intact cells and a grid that has been erased.

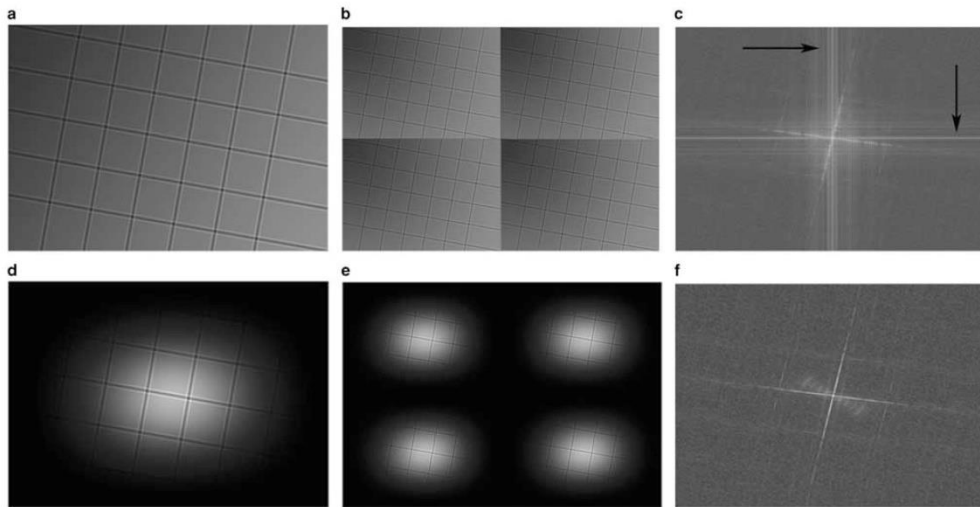


Figure 3. **a:** Original image, **(b)** four images blocks generated by 2D FFT algorithm, **(c)** 2D FFT frequency space, arrows show artefacts created by discontinuities, **(d)** windowed image, **(e)** windowed image blocks, **(f)** 2D FFT frequency space after windowing. 2D FFT, two-dimensional fast Fourier transform.

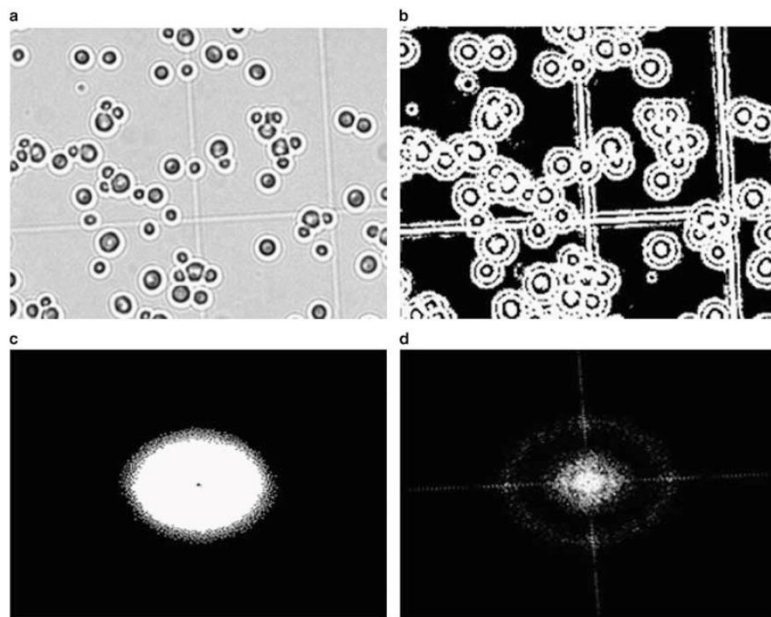


Figure 4. **a:** Original image with low contrast **(b)** image with enhanced contrast **(c)** 2D FFT of original image **(d)** 2D FFT of enhanced contrast image. 2D FFT, two-dimensional fast Fourier transform.

4 Emmanuel Denimal et al.

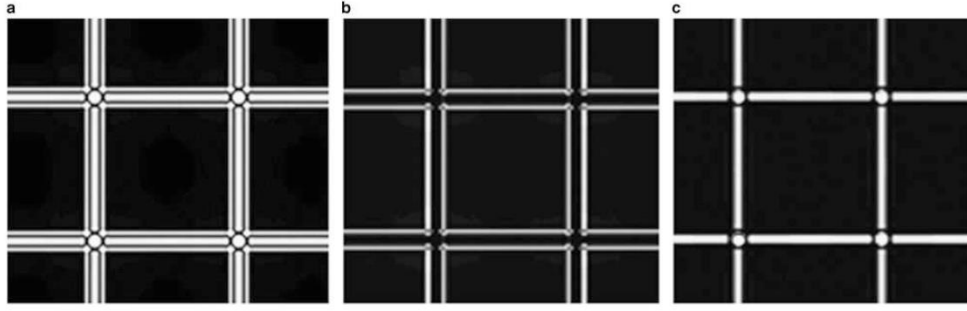


Figure 5. a: Original filter (b) positive part (c) negative part.

RESULTS

Grid Characterization Improvements

Grid positioning accuracy is evaluated by using the relative standard deviation (C_v) of the 20 sub-square areas. C_v is determined by equation (1), where μ is the mean and σ the standard deviation of sub-square area:

$$C_v = 100 \frac{\sigma}{\mu}. \quad (1)$$

From previous work, it is observed that grids whose C_v value is below 1% are accurately positioned. Grids whose C_v value is between 1 and 2% are very well positioned. Grids whose C_v value is between 2 and 5% can show slight inaccuracies in bar positioning. Grids whose C_v exceed 5% are considered inaccurate. In some cases, a C_v over 5% can indicate serious error in grid positioning or, in worse cases, a failure of the algorithm.

For the 135 selected images of the sample, the relative standard deviation of 41 grids is <1%, 67 grids is between 1 and 2% and 25 grids is between 2 and 5%. For the two remaining images, C_v is 6.2 and 21%, respectively.

The optimized algorithm is better on average, but in some cases the original algorithm remains the better of the two. We get the best grid placement accuracy by combining the two methods, and by keeping the results with the lowest C_v .

Figure 6 presents the sorted C_v values for the 135 images, computed first with the original algorithm, second with the optimized algorithm, and third with the combined best results.

With original and optimized algorithms, the amount of precisely positioned grids is 30%, it rises to 46% with the combined method. The amount of well-positioned grids increases from 40 to 50% with the optimized algorithm and is 44% with the combined method. For the calculation of improved C_v , only 132 of the 135 images are considered because the previous algorithm failed in three cases and C_v is not significant. The average C_v is 1.6% with the original algorithm, 1.4% with the optimized algorithm, and decreases to 1.18% with the combined method, which represents a

25.5% improvement in the quality of grid positioning (Table 1).

The number of grids with a $C_v > 5\%$ improved from three grids when using the original algorithm to two grids when using the optimized algorithm. For these two grids, the optimized algorithm does not fail; it returns grids whose C_v is 6.2 and 21%, respectively (71 and 122% with the original algorithm).

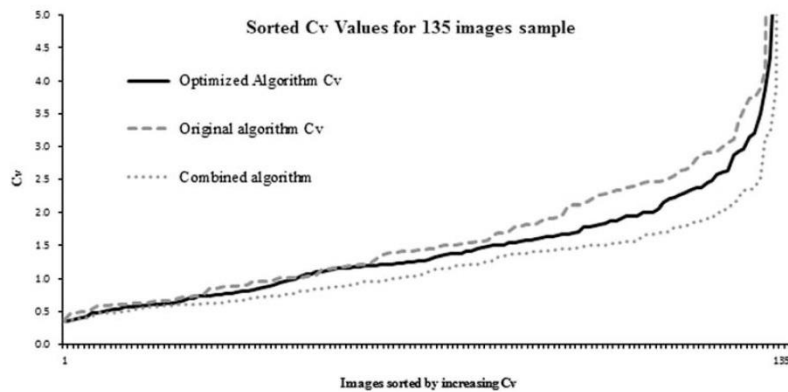
Grid Deletion

Figure 7 shows an example of grid deletion in an image. This deletion process may leave some artefacts (crosses) in the neighborhood of each cell. These artefacts come from the deletion process. It deletes complete lines in the frequency space instead of deleting the exact signature of the grid, which is actually only a part of these lines. An improvement could be done by adequate modeling of this signature; nevertheless, further segmentation processes are not affected by these minor artefacts. Figure 8 shows the gray levels along a bar profile in the original image and in the corrected image. With the optimized algorithm, the profile of gray levels along a bar of the grid is flattened and the background gray levels are lowered.

DISCUSSION

In our previous work, with the same set of images, our algorithm failed for three of them. These failures were the loss of at least one bar of the grid and/or the detection of a false bar. With the optimized algorithm, there is no failure. In the worst case ($C_v = 21$), all bars are detected but they are inaccurately positioned. Note that this image is very specific, it is possible to find adapted settings in order to have a good result, but those particular settings do not work properly for others. We selected a set of settings that leads to 100% success in grid detection because the ultimate goal of this work is to provide an entirely automatic reliable algorithm.

With the original algorithm, 70% of the grids are very well positioned ($C_v < 2$). With the optimized algorithm, 80% of the grids are very well positioned. We observed that for

Figure 6. Sorted C_v values.**Table 1.** Proportion of Image With Accurate, Very Good, Acceptable, and Poor Grid Positioning Depending on the Algorithm.

	Original (%)	Optimized (%)	Combined (%)
$C_v < 1$ —accurate grid positioning	30	30	46
$1 < C_v < 2$ —very good grid positioning	40	50	44
$2 < C_v < 5$ —acceptable grid positioning	28	19	9
$C_v > 5$ —poor grid positioning	2	1	1

some images with low C_v , the original algorithm performs slightly better. A combined result, taking the least C_v from the two methods, leads to a result of 90% of very well-positioned grids. Note that the optimized algorithm does not affect cells that intercept deleted bars of the grid (Fig. 7).

Theoretically, the ROI ratio of Malassez slide should be 0.800. In our previous work, we found a peak located at 0.803 in ROI distribution (Fig. 9).

This discrepancy is statistically significant and is confirmed with the optimized algorithm: a Student compliance test (Dagnelie, 2011) with respect to the theoretical ratio (0.800) was performed on the means of the original and optimized algorithms. The confidence intervals of both means were computed, and the results of the tests are summarized in Table 2. Moreover, a Student paired test (Dagnelie, 2013) between original and optimized algorithms did not reveal any difference between the means ($T_{\text{cal}} = 0.7121$, $df = 133$, $\Pr(> |T_{\text{cal}}|) = 0.4776$). This clearly shows that the Malassez slide used in these experiments has a somewhat biased geometry.

In order to confirm that this discrepancy can be explained by standard tolerances in the building process of Malassez slides, we ran the optimized algorithm on four different models of Malassez slides from three brands and we observed a specific discrepancy for each one (see Fig. 10). Three trademarks were used in the present study: Marienfeld, Poly Labo, and Preciss. Note that two independent Poly Labo slides were taken into account (Poly Labo A and Poly Labo B). The Preciss chamber is composed of one grid square whereas Marienfeld and Poly Labo chambers are composed of two grid squares (in these cases only one grid was used to count yeasts). The Marienfeld chamber is quite different from other slides because the contrast is increased by the presence of a mirror under the grid square. Although some differences occur between the slides the sizing does not vary from one counting chamber to another. We could deduce that the optimized algorithm is sensitive enough to allow discrimination between slides models.

CONCLUSION AND FURTHER WORK

In this work, we proposed an improvement on a previously described method. We used the same criterion of quality as in the previous method and measured the accuracy of grid positioning (C_v). By combining optimized and original algorithms, we obtained a mean improvement of 25.5% and eliminated all cases of failure. We increased from 70 to 80% the proportion of very good results and found that combination of the two methods can lead to a result of 90% of very good results.

The preprocessing and the deletion of grids produces very clean images. We have started further work showing that the use of these processed images really facilitates cell segmentation. We also determined that this optimized method is sensitive enough to distinguish different Malassez slides models.

6 Emmanuel Denimal et al.

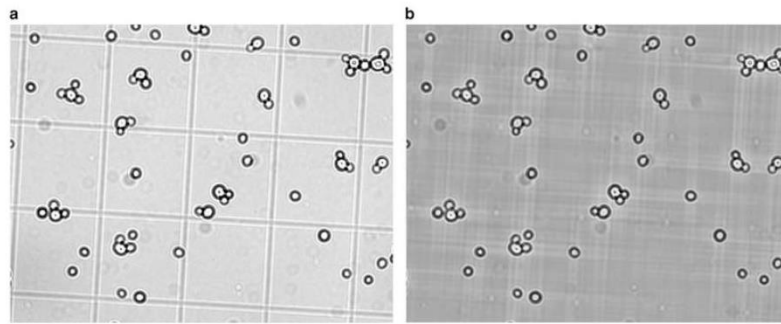


Figure 7. (a) Original image, (b) image with deleted grid.

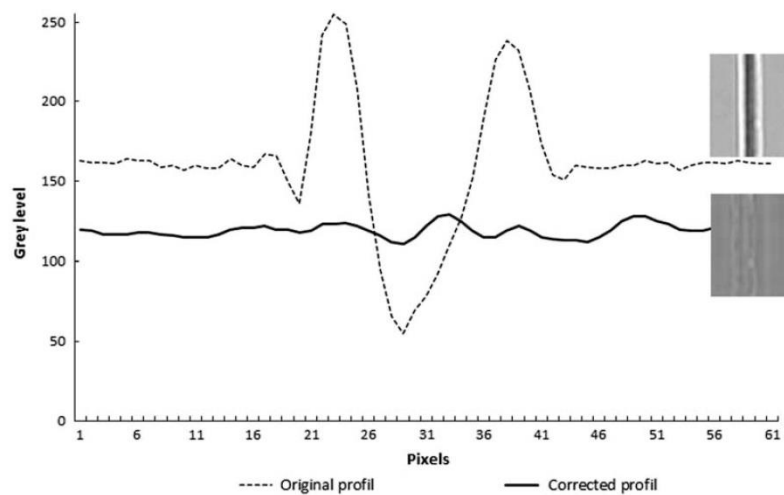


Figure 8. Gray levels along a bar profile in original and corrected image.

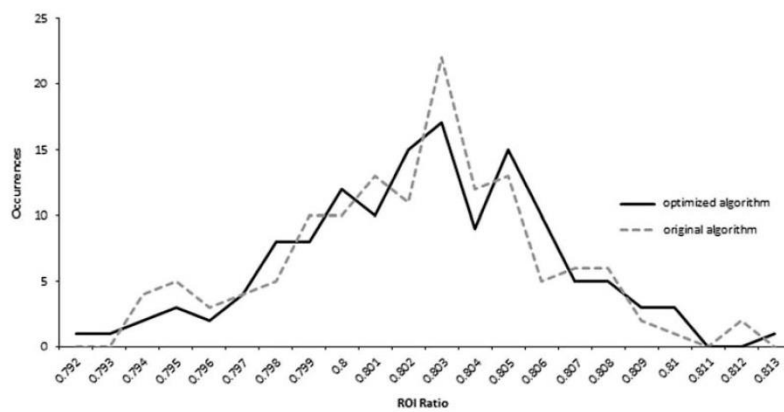


Figure 9. Distribution of ROI ratio for 135 images sampled. ROI, region of interest.

Table 2. Student Compliance Test for the Observed Means for Width-to-Length Ratio.

	Mean	CI	T_{cal}	$Pr(> T_{cal})$
Original algorithm	0.8021	[0.8014 0.8027]	6.12	9.6672e-09
Optimized algorithm	0.8024	[0.8017 0.8030]	7.18	4.4673e-11

CI, confidence interval.

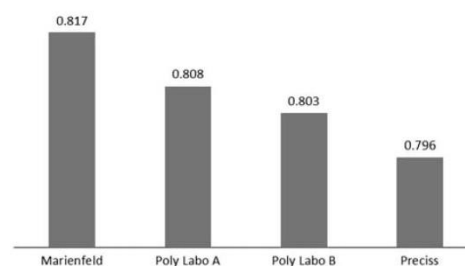
Successively: Observed means, 95% CI for theoretical means, calculated Student t 's, and probabilities of observing such or greater t values under the null hypothesis "theoretical mean = 0.8."

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Pierre André Maréchal, Christine Le Noan and Laurence Dumas for promoting the development of this work, and to the DSI/CCUB staff of the Burgundy university for the help on Matlab® software use.

REFERENCES

- BARGOUGUI, A., LE PAPE, P. & TRIKI, S. (2013). Antiplasmodial efficacy of fruit extracts and cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *J Nat Sci Res* 3, 31–37.
- DAGNELIE, P. (2011). *Statistique Theorique Et Appliquee Vol. 1—Statistique Descriptive Et Bases De L'inference Statistique*, 3rd ed. Paris, Bruxelles: Département de Boeck université.
- DAGNELIE, P. (2013). *Statistique Theorique et Appliquee Vol. 2—Inference Statistique a Une et a Deux Dimensions*, 3rd ed. Paris, Bruxelles: Département de Boeck université.
- KOVESI, P. (1999). Phase preserving denoising of images. *Signal* 4, 1.
- MAI, H., MORIN, B., PARDON, P., GONZALEZ, P., BUDZINSKI, H. & CACHOT, J. (2013). Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Environ Res* 89, 1–8.
- MARIN, A., DENIMAL, E., GUYOT, S., JOURNAUX, L. & MOLIN, P. (2014). A robust generic method for grid detection in white light microscopy Malassez blade images in the context of cell counting. *Microsc Microanal* 21, 239–248.
- PHILIPPE, D., STANISLAS, D.B. & CLAUDE, M.A. (2014). Isolation and screening of yeast strains involved in performing of traditional production process of cassava bioethanol. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3, 671–684.
- VALQUE, H., GOUYER, V., GOTTRAND, F. & DESSEYN, J.-L. (2012). MUC5B leads to aggressive behavior of breast cancer MCF7 cells. *PloS One* 7, e46699.
- VOICU, L.I., MYLER, H.R. & WEEKS, A.R. (1997). Practical considerations on color image enhancement using homomorphic filtering. *J Electron Imaging* 6, 108–113.
- WILLIAMS, D.B. & MADISETTI, V. (1997). *Digital Signal Processing Handbook*. London: CRC Press, Inc.

**Figure 10.** Measured ROI by Malassez slides model. ROI, region of interest.

c. Avantage de l'approche fréquentielle dans l'effacement de la grille.

Le résultat de l'application de la technique d'effacement fréquentielle est présenté dans la Figure 82.

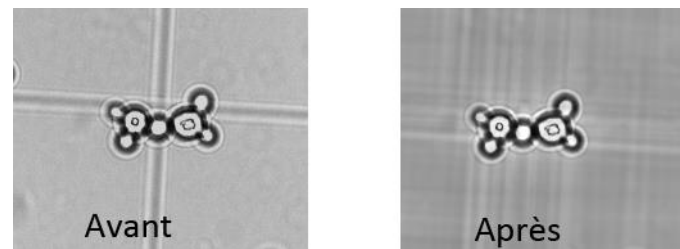


FIGURE 82 APPLICATION DE L'EFFACEMENT FREQUENTIELLE DE LA GRILLE.

Le but que nous nous étions fixé est atteint : aucune déformation ni aucun découpage des cellules chevauchant les barreaux n'est visible. Nous constatons uniquement un effet diffus sur le fond de l'image qui semble lié à la présence des cellules et à l'orientation de la grille.

Le résultat principal de l'article (E. Denimal et al. 2015), à savoir l'effacement de la grille sans altération des cellules, n'a pu être comparé à aucune technique dans le domaine spatial, car aucune publication n'y fait référence, et cela nous semble aujourd'hui irréalisable en travaillant uniquement dans le domaine image.

d. Perfectionnement de l'effacement de la grille : suppression de l'effet « queue de comète ».

Postérieurement à la publication de l'article (E. Denimal et al. 2015), nous avons cherché à optimiser l'effacement de la grille pour éliminer les artefacts encore présents. Ces traces qui forment ce que nous appellerons poétiquement des « queues de comètes » apparaissent autour de chaque cellule et suivent l'alignement de la grille. Figure 83.

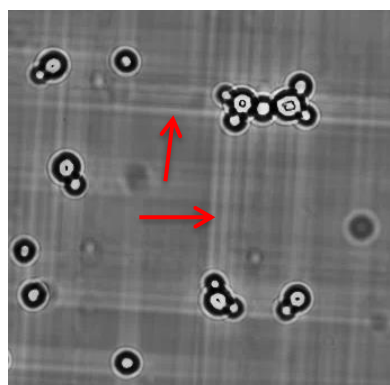


FIGURE 83 ILLUSTRATION DU PHENOMENE DE QUEUE DE COMETE, CONTRASTE AUGMENTE DE 40%.

Lors du processus d'accumulation que nous avons utilisé dans le chapitre « La détection et le comptage des cellules, L'effacement de la grille » page 138, ces « queues de comètes » sont susceptibles

d'échapper au seuillage d'Otsu (Otsu 1979) et de générer des gradients parasites. Ces artefacts, multipliés par le nombre de cellules, ajoutés aux résidus de la grille potentiellement encore présents après l'effacement, contribuent à polluer l'image et rendre la segmentation ultérieure des cellules inutilement plus délicates.

Ce constat nous a conduits à affiner notre technique d'effacement. Nous avons donc cherché à comprendre leur origine et à réduire autant que possible leurs intensités.

i. L'origine des « queues de comètes »

Préalablement, nous avons cherché à isoler et à reproduire cet artefact. Pour cela, nous avons travaillé à partir d'images synthétiques simplifiées au maximum (Figure 84A).

D'un point de vue schématique, une cellule de levure dans une image microscopique peut être assimilée à un disque. Nous avons donc généré une image comprenant 3 disques blancs sur fond noir, sans grille et sans aucune autre perturbation.

Nous avons étudié l'impact de la méthode de suppression de la grille présentée dans l'article (E. Denimal et al. 2015), à savoir, la mise à zéro des cellules de la matrice des fréquences le long d'une ligne (Figure 84B,C).

Il apparaît clairement ce que nous avons nommé des « queues de comètes ». Ces traces apparaissent autour de chaque disque (figurant des cellules). Elles suivent également l'orientation des deux axes le long desquels nous avons réalisé la mise à zéro. (Figure 84D)

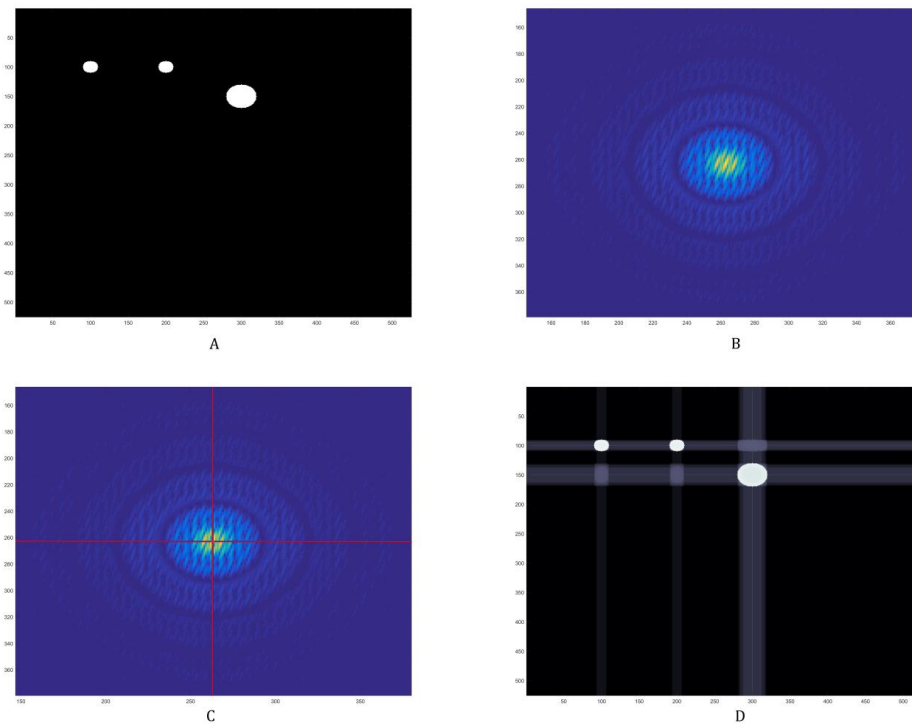


FIGURE 84 L'ORIGINE DES QUEUES DE COMETES. A) IMAGE SYNTHETIQUE AVEC 3 DISQUES; B) ESPACE DES FREQUENCES PRODUIT PAR LA FFT; C) EN ROUGE, L'EFFACEMENT DES FREQUENCES LE LONG DE DEUX AXES SIMULANT LE FILTRAGE D'UNE SIGNATURE DE GRILLE; D) RECONSTRUCTION DE L'IMAGE LAISSANT APPARAÎTRE LE PHÉNOMÈNE DE « QUEUES DE COMETES ».

ii. Pour en finir avec les queues de comètes.

Une observation plus attentive de la signature de la grille montre que ce signal est plus complexe que notre simple approximation linéaire. Ceci est d'autant plus vrai lorsque la grille présente un biais de rotation comme nous pouvons le constater sur la Figure 85.

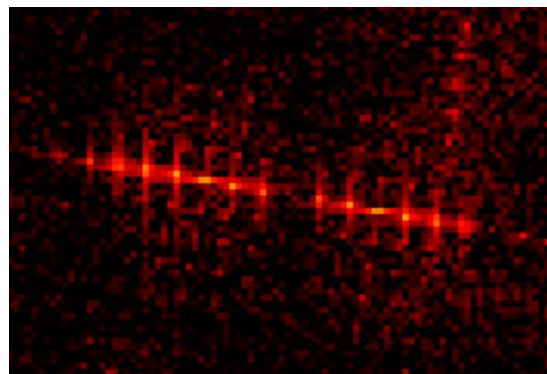


FIGURE 85 EXTRAIT DE L'ESPACE DES FREQUENCES EN GROS PLAN MONTRANT UNE SIGNATURE D'UNE GRILLE AVEC UNE LÈGÈRE ROTATION (ENVIRONS 4°)

Une modélisation fidèle de ce signal apparaît comme un objectif difficile à atteindre en particulier à cause de la discrétisation d'une ligne oblique dans une image informatique. Nous avons renoncé à modéliser précisément le signal fréquentiel d'une grille oblique et quoi qu'il en soit, nous sommes

conscients qu'il est vain d'espérer un résultat parfait, car chaque point de l'espace des fréquences est la résultante d'un calcul réalisé sur l'ensemble des points de l'image. L'altération locale de l'espace des fréquences affectera donc l'ensemble de l'image.

Cependant, nous avons tout de même pu apporter quelques modifications dans l'algorithme de suppression qui améliorent sensiblement les résultats.

Le premier constat à faire est qu'une ligne de 1 pixel d'épaisseur semble insuffisante pour masquer tout le signal. Pour l'altération de l'espace des fréquences de la DFT 2D, nous avons donc choisi d'utiliser un bandeau suffisamment large (environ 15 pixels, défini empiriquement) pour couvrir tout le signal visible.

Le second constat est qu'au vu des tests réalisés dans le paragraphe précédent, mettre à zéro les valeurs le long d'une ligne tracée dans l'espace des fréquences est un procédé qui manque de finesse. Nous avons donc calculé des valeurs de remplacement mieux adaptées. Nous procédons de la manière suivante :

1. Nous calculons la valeur moyenne des modules le long des cercles d'isofréquences.
2. Nous faisons varier le rayon de ces cercles d'isofréquences de 1 à R , R étant le rayon du plus grand cercle inscrit dans l'image (Figure 86A).
3. Nous remplaçons les valeurs des modules représentant le signal de la grille (délimité par le bandeau) par les valeurs moyennes calculées qui s'intègrent mieux dans leurs contextes (Figure 86 B,C).

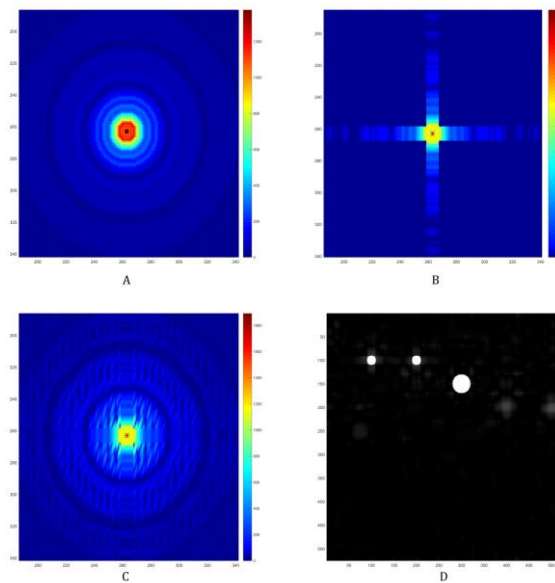
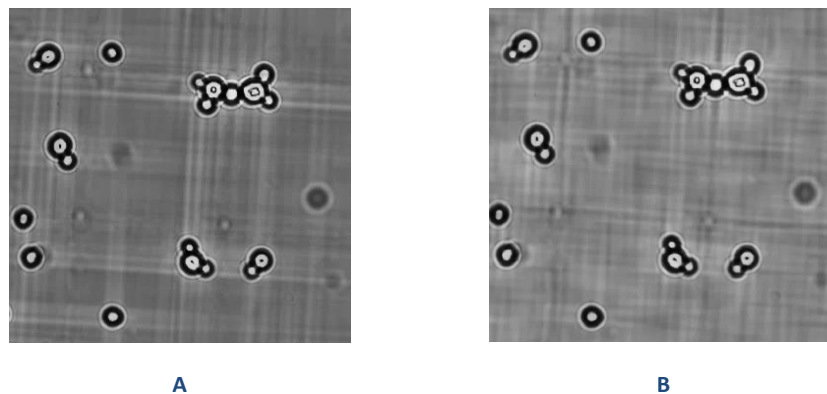


FIGURE 86 PRINCIPE DE REDUCTION DE L'EFFET QUEUE DE COMETE. **A)** MODULES MOYENS SUR LES CERCLES D'ISOFREQUENCES CALCULES A PARTIR DE L'ESPACE DES FREQUENCES, **B)** MASQUAGE DES CERCLES D'ISOFREQUENCES PAR DES BANDES DE 15 PIXELS DE LARGE LE LONG DE LA SIGNATURE DE LA GRILLE, **C)** REMPLACEMENT DES VALEURS DES MODULES DANS L'ESPACE DES FREQUENCES, **D)** RECONSTRUCTION A PARTIR DE L'ESPACE DES FREQUENCES MODIFIE. LE CONTRASTE A ETE AUGMENTE POUR METTRE EN EVIDENCE LES RESTES D'ARTEFACTS.

L'amélioration obtenue par rapport à l'image présentée sur la Figure 84D est visible sur la Figure 86D. L'application de ce principe sur une image réelle confirme l'amélioration du résultat (Figure 87). L'intensité de l'artefact est réduite. Le contraste des deux images a été augmenté de 40%, et la luminosité diminuée de 20% de manière à accentuer la visibilité des queues de comètes.

FIGURE 87



REDUCTION DE L'EFFET QUEUE DE COMETE SUR UNE IMAGE REELLE. **A)** EFFACEMENT DE LA GRILLE "SIMPLE" PRESENCE D'ARTEFACT QUEUE DE COMETE **B)** EFFACEMENT DE LA GRILLE OPTIMISE, PRESENCE D'ARTEFACT REDUITE.

3. La détection et le comptage des cellules

a. Pourquoi choisir la transformée de Hough par gradient ?

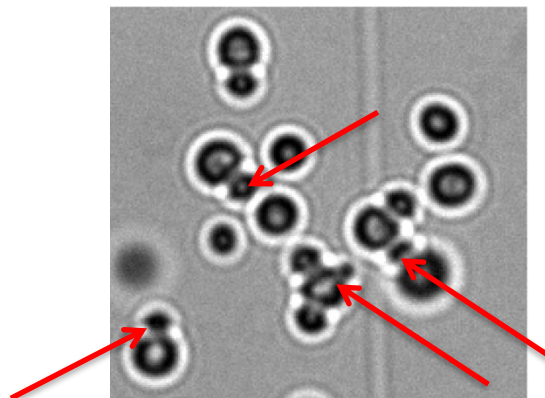
Dans ce chapitre, nous nous concentrons sur la détection et le dénombrement des levures. Pour la grille qui est essentiellement un objet à base de lignes droites, nous avons utilisé la transformée de

Hough linéaire. Les levures sont, elles, des formes pseudo-circulaires. L'emploi de la transformée de Hough circulaire (CHT) est donc a priori naturel.

Cependant, les images des cellules produites lors de l'expérience de notre étude présentent des particularités en termes de détection de forme circulaire.

- ✓ Les cellules forment sur les images microscopiques des cercles de 10 à 15 pixels de diamètre environ, ce qui est relativement petit.
- ✓ Du fait des difficultés de mise au point, dues à l'opérateur ou notamment à la présence de glycérol, certaines images ont des contours flous.
- ✓ Certaines cellules sont accolées, déformant ainsi leur périmètre dans des proportions qui justifient pleinement l'emploi du terme « pseudo » dans « pseudo circulaire » (Figure 88).

Nous devons également faire face à certaines autres difficultés qui ont été présentées dans le chapitre « **Présentation** du cas applicatif de ces travaux, **L'obtention des images** », page 86 et en conséquence, nous traiterons préalablement les images pour éliminer le bruit de fond et uniformiser la luminosité. Ces traitements sont décrits dans le paragraphe « **Traitement initial des images** » page 105.



**FIGURE 88 CELLULES DE LEVURES FORMANT UN AMAS ET DEFORMATION DU PERIMETRE DE CERTAINES CELLULES (FLECHES ROUGES).
LE FLOU EST DU A LA PRESENCE DE GLYCEROL.**

Une difficulté en particulier concerne la détection des points de contour, essentielle pour obtenir une transformée de Hough circulaire précise (figure 88). En effet, en raison de la présence de glycérol, la lumière est fortement diffractée et cela crée un flou sur les images. Voir Figure 88. Ce flou peut perturber les algorithmes de détections de contours de type Canny ou Sobel, prérequis pour la mise en œuvre d'une CHT. En fonction des seuils de sensibilité utilisés, ces algorithmes verront ou ne verront pas de ligne de contour, ou ils seront amenés à tracer des contours arbitraires. De manière à extraire le maximum d'informations présentes dans les images, nous avons opté pour une méthode qui puisse tirer parti de ce flou ou à minima, ne pas être pénalisé par sa présence. De fait, compte tenu des spécificités de notre application, nous nous sommes orientés vers une transformée de Hough par gradient (GAT) plutôt que vers la version originale (CHT). La GAT possède en outre la particularité

d'avoir un espace des paramètres plus compact et offre la possibilité de faire des recherches sur des plages de rayon plus étendues. Notre méthode basée sur la GAT modifiée, qui ne s'appuie pas sur des points de contours, se révèle plus robuste lors de l'étude d'objets aux contours flous.

b. Calcul du champ de gradients dans l'image.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, le flou des objets dans l'image est un problème pour les filtres classiques de détections de contours. C'est ce qui nous a orientés vers la GAT. Cependant, il nous faut tout de même une approximation relativement précise de la direction des normales de ces contours, car l'efficacité de la GAT en dépend.

Le flou sur nos images résulte en réalité de la combinaison de plusieurs facteurs dont les trois principaux sont : la diffraction de la lumière à cause de la présence de glycérol, le mauvais réglage du système optique dû à l'opérateur et à une faible profondeur de champ. Ce dernier cas est un peu particulier : il apparaît quand l'opérateur n'a pas attendu suffisamment longtemps pour laisser sédimenter les cellules dans le plan focal du microscope. Sur une même image, certaines cellules peuvent donc être nettes, car elles sont dans le plan focal tandis que certaines autres seront floues, car elles sont restées au-dessus du plan focal. Ce flou permet de diminuer l'erreur commise sur les calculs d'orientation que nous serions amenés à faire si nous traitions des contours discrétisés parfaitement définis, car chaque pixel est alors défini comme une fonction dépendante de son voisinage. Le flou, dans ce cas, réalise de fait une moyenne des gradients voisins, et diminue le biais que pourrait présenter un calcul de gradient sur une ligne, c'est-à-dire sur quelques pixels d'une courbe discrétisée. Il représente donc ici un avantage.

Dans notre approche, nous renonçons (provisoirement) à définir les lignes de contours et nous avons opté pour le calcul du champ des gradients dans l'image entière. De cette façon, nous exploitons l'information de tous les pixels disponibles et exploitons indirectement le flou présent pour augmenter la précision du calcul des normales, et s'il n'y en a pas, nous en créons un. Ainsi, pour calculer ce champ de gradients, nous réalisons une convolution de l'image avec la dérivée du premier ordre d'un noyau gaussien (Figure 89). Ce choix nous permet de tenir compte du voisinage de chaque point pour caractériser au mieux la direction du gradient en ce point dans l'environnement d'une cellule. En procédant de la sorte, nous apportons de la robustesse, car nous traitons de la même façon les images floues et les images nettes, sans intervention humaine ou calculs supplémentaires, car l'application de la convolution sur les images déjà floues ne modifiera pas le résultat concernant l'orientation du gradient.

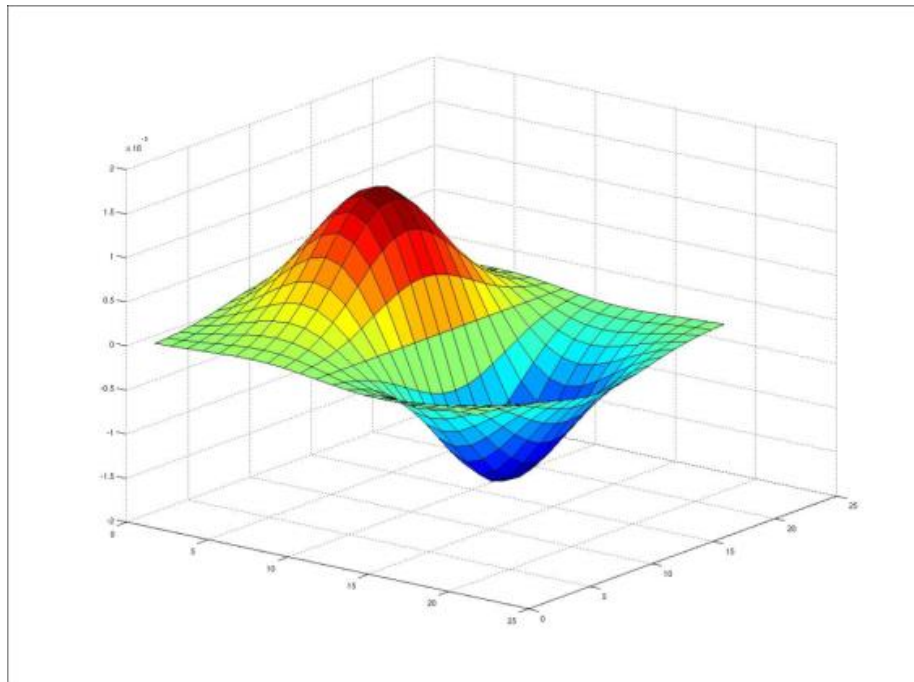


FIGURE 89 DERIVEE DU PREMIER ORDRE D'UNE GAUSSIENNE.

Une fois la convolution appliquée, nous sélectionnons les gradients ayant une magnitude significative. Le critère de sélection est défini sans intervention humaine par l'application de la méthode d'Otsu (Otsu 1979) sur la matrice des magnitudes de façon à respecter nos contraintes d'automatisation. Nous pouvons noter que ce critère de sélection n'affecte les performances de la méthode qu'en termes de vitesse de traitement (moins de gradients à exploiter) et non en termes de précision (les gradients faibles issus du fond uniforme ne donnent pas d'orientations utiles). Le champ de gradient ainsi obtenu, voir Figure 90, est ainsi relativement précis, et nous constatons déjà de manière intuitive que les vecteurs indiquant la direction des gradients semblent converger assez nettement vers le centre de la cellule, indiqué en rouge, malgré sa forme pseudo circulaire.

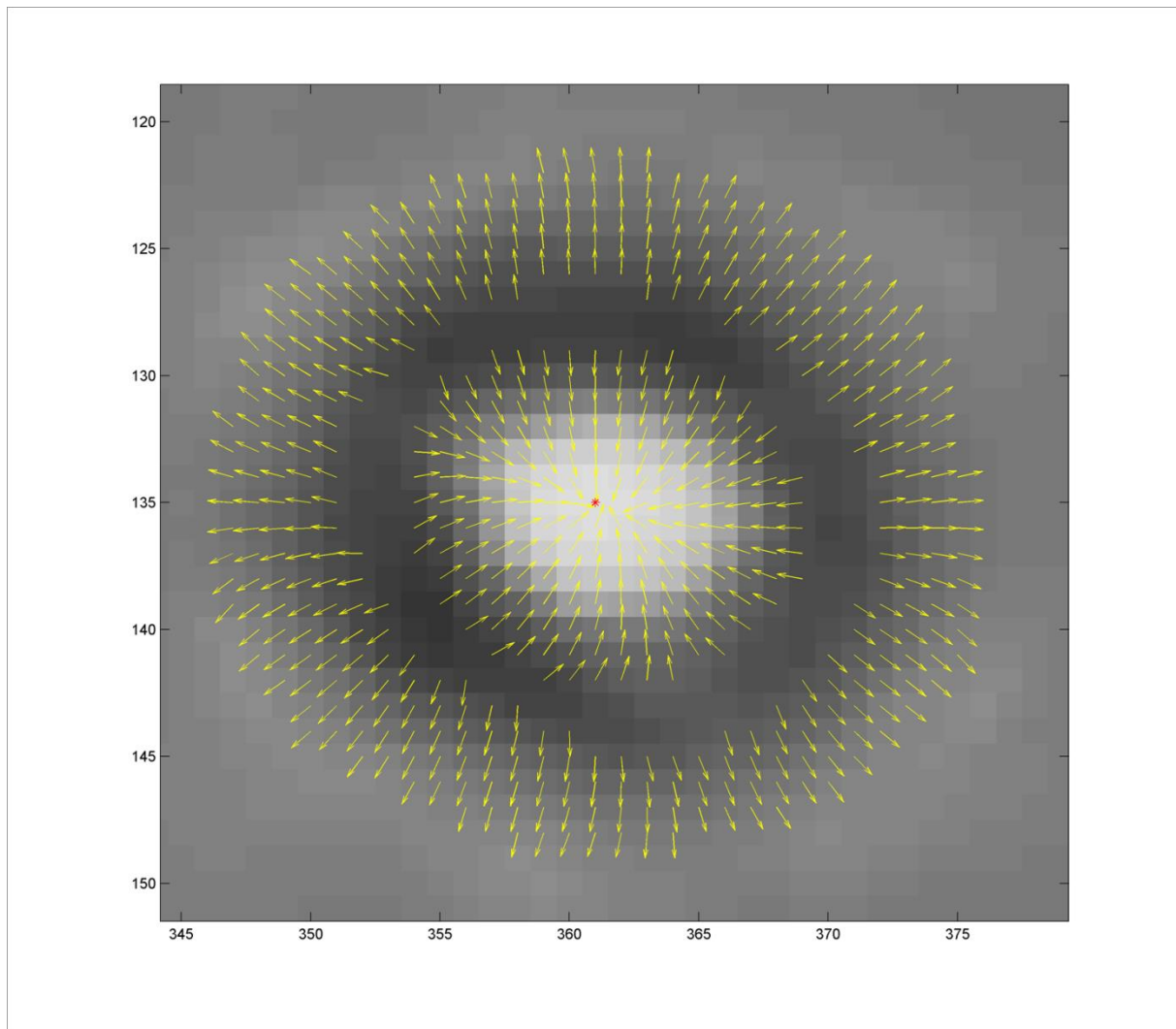


FIGURE 90 CHAMP DE GRADIENT D'UNE CELLULE FLOUE. LES FLECHES JAUNES INDIQUENT LA DIRECTION DES GRADIENTS, EN ROUGE LE POINT DE CONVERGENCE PRINCIPAL DE TOUS LES GRADIENTS

c. Introduction de nombres complexes dans le processus d'accumulation.

Les processus classiques basés sur la notion d'accumulateur (transformée de Hough circulaire, linéaire, par gradient, etc.) utilisent une stratégie de vote basée sur un incrément 1. Dans le cas de la GAT, une stratégie plus subtile, basée sur le concept de résonance (Figure 91), a été introduite par Atherton et Kerbyson (Atherton et Kerbyson 1999).

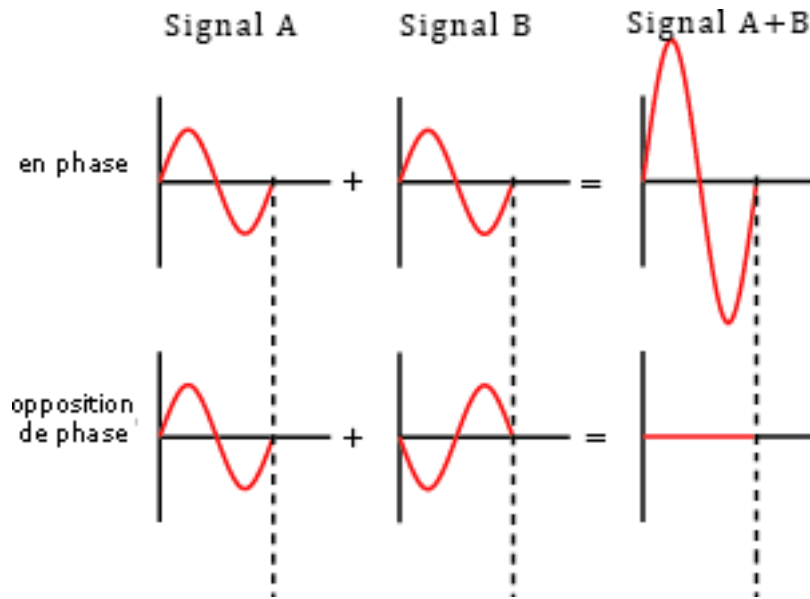


FIGURE 91 ILLUSTRATION DU PRINCIPE DE RESONNANCE.

L'idée principale de cette technique est de coder le rayon du cercle dans la phase d'un complexe de module 1 selon l'Équation 15. À la place de l'incrément simple, nous adoptons pour notre application ce changement d'approche, repris également par (Cicconet, Geiger, et Werman 2015). Les votes dans l'accumulateur deviendront des nombres complexes dont les phases seront échelonnées entre 0 et 2π le long de la plage de rayon, voir Équation 15. L'intérêt est qu'en s'additionnant, les votes des intersections de segments issus de points d'intérêt qui ne sont pas du même cercle seront déphasées, ils généreront donc des valeurs de moindre intensité que ceux qui sont en phase (c'est-à-dire issus de points situés sur le même cercle), réduisant ainsi l'intensité du bruit de fond et augmentant la dynamique dans l'accumulateur. Voir Équation 16 et Figure 92.

ÉQUATION 15 INCREMENT DE VOTE COMPLEXE.

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

Avec k le rayon considéré et N le rayon maximum

ÉQUATION 16 MODULE DE LA SOMME DE DEUX COMPLEXES DEPHASES

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

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

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

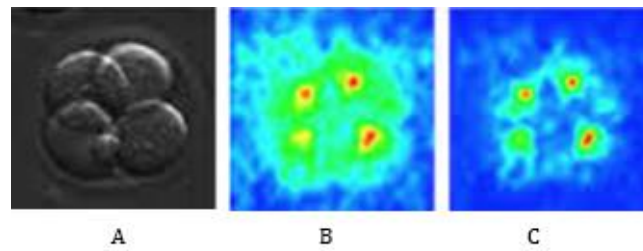


FIGURE 92 UTILISATION DE VOTE COMPLEXE. A) IMAGE ORIGINALE, B) ACCUMULATEUR CLASSIQUE, C) ACCUMULATEUR COMPLEXE. D'APRES (CICCONET, GEIGER, ET WERMAN 2015)

d. Introduction des LCL et des UCM

Dans la littérature étudiée, les auteurs présentent beaucoup de techniques pour détecter UN pic et présentent assez peu de méthodes pour ce qui est de la recherche de plusieurs pics et ces méthodes sont essentiellement basées sur des seuils d'intensité maximale et/ou des systèmes dits « d'emporte-pièce ». La méthode la plus commune consiste à déterminer une valeur seuil, en général un pourcentage de la valeur du pic d'intensité maximale, et à rejeter tous les pics d'intensité inférieure (Davies 1988; Kierkegaard 1992). Ce processus est généralement itératif et s'accompagne d'une mise à zéro du voisinage du pic traité (notion d'emporte-pièce, voir Figure 93). Ce type d'approche peut conduire à des faux positifs ou à des faux négatifs suivant la valeur du pourcentage choisi et les dimensions de l'emporte-pièce employé. Une illustration de ce problème est présentée dans la Figure 93. Dans cette illustration, nous constatons à l'itération 1 que l'opération de masquage a effacé les valeurs relatives au centre du petit cercle. Il n'y aura donc aucune chance pour que la méthode trouve ce cercle ultérieurement. Cela produira donc un faux négatif, c'est-à-dire une cellule oubliée dans le comptage. À l'itération 2 le maximum local indique à présent une position qui ne correspond plus à un centre réel, mais simplement à un « résidu » du centre précédemment effacé, cela conduit alors à un faux positif, c'est-à-dire un comptage de cellule qui n'existe pas.

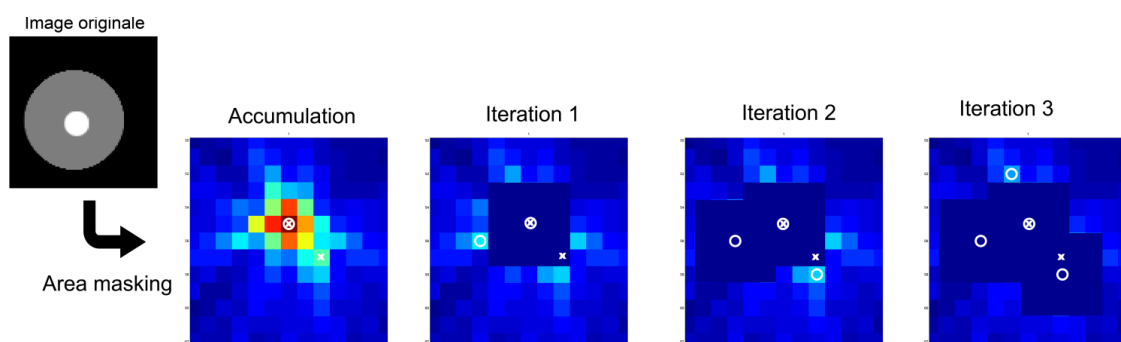


FIGURE 93 ITERATION SUCCESSIVE DE LA TECHNIQUE DE L'EMPORTE-PIECE. LES X BLANCS SONT LES CENTRES THEORIQUES A TROUVER, LES O BLANCS SONT LES CENTRES EFFECTIVEMENT "VUS" PAR LA METHODE.

Pour résoudre ce problème, nous avons introduit deux nouvelles structures de données associées à la GAT : la liste des contributeurs locaux ou Local Contributors List (LCL) et la matrice des contributeurs

déjà utilisés ou Used Contributors Matrix (UCM). La LCL contient, en chaque point de la matrice d'accumulation, la liste des contributeurs ayant participé à l'incrémentation de cette case. Figure 94. La construction de la structure se fait selon le principe :

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

Les cercles représentent des points de départ de gradient.

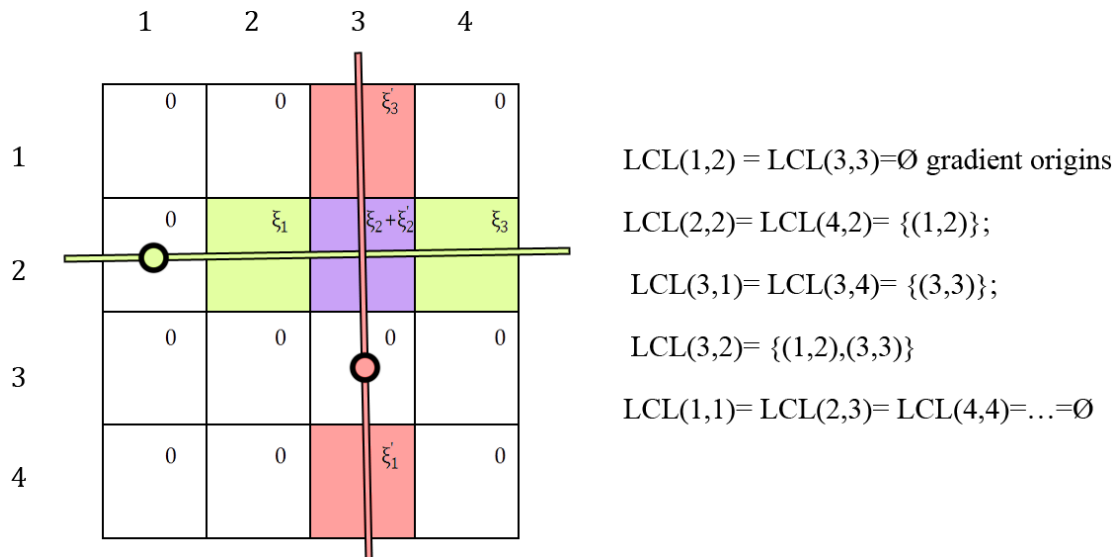


FIGURE 94 PRINCIPE DE CREATION DE LA "LOCAL CONTRIBUTORS LIST" (LCL)

Quant à l'UCM, c'est une matrice d'entiers de même taille que l'image. Au cours de chaque itération de recherche d'un maxima dans l'accumulateur (un pic), la LCL correspondant aux coordonnées de ce pic est analysée. Aux coordonnées de chaque contributeur de ce pic, la cellule UCM correspondant est affectée du numéro du pic actuel si elle n'est pas déjà affectée. De fait, elle contient pour chaque contributeur le numéro du centre de convergence (centre potentiel de cercle) auquel il participe principalement, étant entendu qu'un contributeur peut participer à la construction de plusieurs pics (centres). Cela permet alors de rattacher d'éventuels maximum résiduels au centre réel et ne pas les compter comme de nouveaux centres (cas illustré à l'itération 1 de la Figure 93). La Figure 95 montre un exemple de matrice UCM déjà remplie. P1 est le premier pic détecté, et ces contributeurs sont donc répertoriés par des « 1 », P2 est le pic secondaire, ses contributeurs sont répertoriés par des « 2 ». Bien qu'ayant des contributeurs en commun (les trois « 1 » au centre dans la 5e colonne), ces contributeurs sont rattachés exclusivement au pic 1.

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

FIGURE 95 PRINCIPE DE LA MATRICE UCM

Ces deux structures conservent en quelque sorte un historique de la construction de la matrice d'accumulation et de la création de chacun des centres de convergence.

La LCL permet de « détricoter » l'accumulateur et l'UCM permet de réduire le nombre de faux positifs en rattachant un pic « secondaire » (pic présent, mais non imputable à une forme circulaire) à un pic « primaire » précédemment détecté. Dans la Figure 93, cela permet à l'itération 1 de ne pas comptabiliser le nouveau maximum comme un nouveau centre, mais de le rattacher au premier centre en évitant alors de créer un faux positif.

Dans notre approche, les LCL combinées aux UCM sont partie intégrante de l'algorithme de détection et d'identification des pics, c'est-à-dire des centres possibles de formes circulaires. Ils permettent notamment la déconstruction « intelligente » des pics dans l'accumulateur, ce qui réduit le risque de faux négatif (exemple des cellules bourgeonnantes qui forment de petits cercles à proximité immédiate de plus grands cercles, trop facilement effacées par un emporte-pièce comme illustré Figure 93) et de faux positifs, ainsi qu'une meilleure fiabilité en cas de cercles de tailles hétérogènes (voir à ce sujet l'article (Emmanuel Denimal et al. 2017) figure 13 et 14).

e. Article 3, le comptage des cellules

Le lecteur trouvera ci-contre la reproduction du second article publié en tant que premier auteur, constituant le troisième élément de ma contribution dans le cadre de ce travail de thèse.

Automatic Biological Cell Counting Using a Modified Gradient Hough Transform

Emmanuel Denimal,^{1,*} Ambroise Marin,¹ Stéphane Guyot,¹ Ludovic Journaux,^{1,2} and Paul Molin¹¹AgroSup Dijon, Université Bourgogne Franche-Comté, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France²AgroSupDijon, Université Bourgogne Franche-Comté, Le2i FRE2005 F-21000 Dijon, France

Abstract: We present a computational method for pseudo-circular object detection and quantitative characterization in digital images, using the gradient accumulation matrix as a basic tool. This Gradient Accumulation Transform (GAT) was first introduced in 1992 by Kierkegaard and recently used by Kaytanli & Valentine. In the present article, we modify the approach by using the phase coding studied by Cicconet, and by adding a “local contributor list” (LCL) as well as a “used contributor matrix” (UCM), which allow for accurate peak detection and exploitation. These changes help make the GAT algorithm a robust and precise method to automatically detect pseudo-circular objects in a microscopic image. We then present an application of the method to cell counting in microbiological images.

Key words: microscopy, cell, counting, hough, circle

INTRODUCTION

The goal of our project is to automatically detect, count and characterize cells in biological microscopic images, in very different conditions, with very low prior knowledge and zero or minimal manual settings. Figure 1 shows a sample illustrating the variability of the images that we examined for this project. The challenge was to build a robust algorithm which could work accurately, whatever the viewing conditions and the quality of the image, without manual settings.

Preliminary studies have shown that classical algorithms have trouble in some common situations in microbiology. For example, budding cells, agglomerated cells, cells with soft edges are difficult to detect accurately. In the context of cell counting in microscopic image analysis, the classic algorithms used in biology laboratories, implemented, for example, in the ImageJ software application (Lehmussola et al., 2006; Cai et al., 2011; Kumagai & Hotta, 2012), are not robust enough with respect to inter-image variability. This forces biologists to manually customize the software settings or algorithm parameters for almost every image or series of images. This has a direct impact on the reliability of cell counting and prevents its automation.

In order to improve the automation of cell counting, we suggest modification of the Gradient Accumulation Transform (GAT) method presented by Kierkegaard (1992) and used by Kaytanli & Valentine (2013). This method is based on three ideas. First, a pixel of the image is suspected to be the location of a cell edge if, at this point, there exists a gradient. But this is only a suspicion. The reverse is not true. The existence of a gradient at a point does not necessarily

imply a cell edge. Second, two neighboring points belonging to the edge of a cell have almost the same tangential profile, so that if a tangential gradient exists, it is very weak. The gradients in these neighboring points are both oriented toward the center of the cell. Third, if we draw the straight lines underlying the gradients, they intersect at the center of the cell. So if a point is the locus of many gradient intersections, it is very likely to be the center of a cell. In differential geometry, this method is analogous to the search for centers of curvature, i.e., calculating the evolute of a curve. In classical methods, those intersections for each relevant gradient in the image are counted and reported in an accumulation array *A*, which is called the parameter space or voting space. Figure 2 shows a summary of these ideas.

The problem of the construction of *A* has been studied by Cicconet et al. (2015). These authors compared four methods of accumulation: constant real weighted accumulation, constant real unweighted accumulation, complex weighted accumulation, and complex unweighted accumulation. They concluded that the complex weighted accumulation method give the best results for their application. It seemed to us that such a weighting choice might decrease the sensibility of the method, especially in cases of heterogeneous cell contrasts. In other words, to detect circular objects with low contrast, using gradient amplitude for the increment can lead to an unsuccessful detection.

The idea of using gradients to determine and characterize circles in an image is not new. In Liu et al. (2011), the authors present a method to vectorize images and find arcs. The centers of circles are defined as intersections of gradients. In Rad et al. (2003), the authors develop a method of preprocessing images to detect circles brighter or darker than the background. The method is based on the study of opposite gradient pairs. The concept of discrete evolute curve

Received July 12, 2016; accepted November 30, 2016

*Corresponding author. emmanuel.denimal@agrosupdijon.fr

2 Emmanuel Denimal et al.

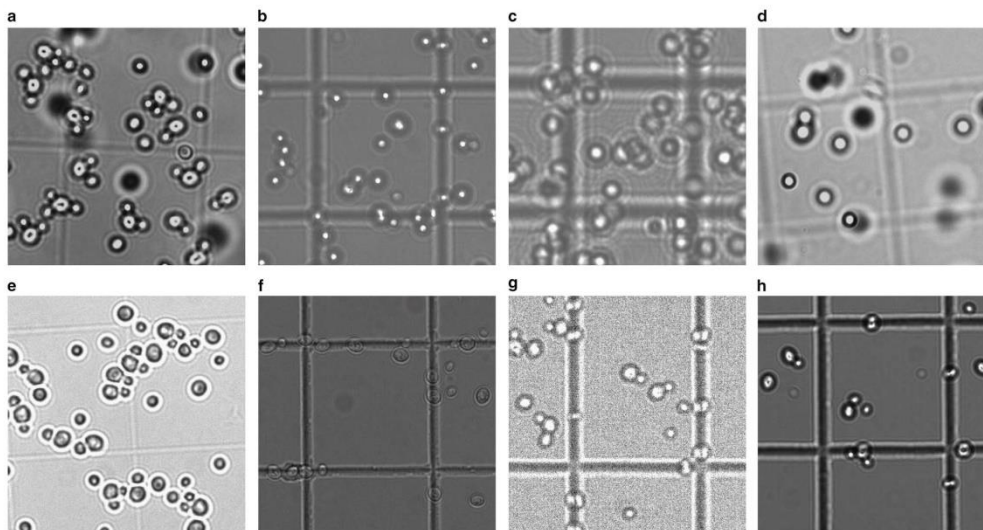


Figure 1. Grayscale images of yeasts sandwiched between a Malassez grid and a coverslip. **a,h:** budding cells. **b,c:** High glycerol concentration, **(d)** bad sedimentation, **(e)** yeasts clusters, **(f)** low contrast, **(g)** electronic noise.

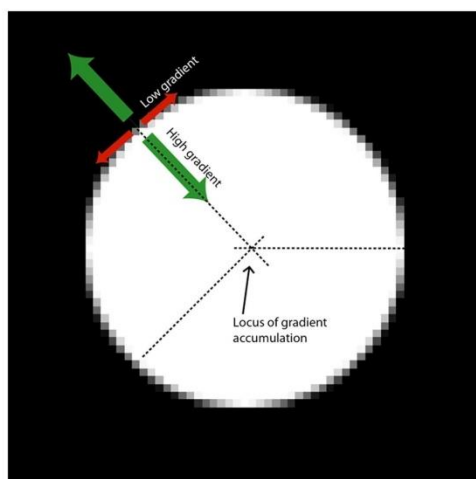


Figure 2. Underlying ideas of gradient accumulation method.

was also described in Tao et al. (2008), where the authors follow the arcs in the processed image, and determine the centers of curvature by least square fitting. The stationary points of this algorithm are the supposed centers of circles. Gradients were also used in an iterative method to determine the centers of circles in semi-conductor images (Timm & Barth, 2011). In Kierkegaard (1992), the author gave a clear definition of the so-called gradient accumulation method.

Most of these Circular Hough Transform (CHT) methods use common steps. For example, to achieve contour detection in original image, a Sobel filter is used (Davies, 2004). Then, to find peaks in the accumulation array (also called voting space, parameters space, accumulator, etc. in the literature), the traditional methods use a threshold based on the maximum value of this array (a peak). Using global thresholding, can lead to non-detection of the lowest peaks. Some algorithms use an iterative process for searching peaks, using a mask at each step to overshadow the current peak in order to find the next maximum value in the array. Choosing the right size for this mask is not easy. Using a too large mask can eliminate a neighboring peak and lead to not detect an existing cell (case of budding cells). Conversely, a too small mask can lead to false positives by detecting a part of a previous peak.

Our algorithm is mainly based on the accumulation of gradients, as described in Kierkegaard (1992) and Timm & Barth (2011). The first modification that we introduce is the use of a first-order derivative of a two-dimensional (2D) Gaussian distribution, instead of the Sobel filter. This choice allows an improved extraction of gradient information in the case of fuzzy edges.

The second modification consists in introducing and using new data structures we call local contributor list (LCL) and used contributors matrix (UCM). For each point of the accumulation array, resorting to its contributors enriches the information associated with each candidate center. This introduces an alternative to the thresholding and masking in order to find relevant maxima in the accumulation array. The intake of this algorithm is its

sturdiness regarding viewing conditions (Figs. 1c, 1d, 1f, 1g), object density (Figs. 1a, 1e) and budding phenomena (Figs. 1a, 1e, 1h).

The following pages are structured as follows. First, we will explain in detail the data structures we used: accumulation matrix, LCL, and UCM. Second, we will present our main contribution, namely, how to exploit these data structures by introducing new methods made possible by LCL and UCM. Third, we will describe the application to yeast cell counting in white light microscopy, and finally, a statistical study of “human versus automated” cell counting [“Daneel” counting (Asimov, 1954)] is presented.

METHODS

Data Structures

Accumulation Array

We adopt the paradigm shift proposed by Cicconet et al. (2015) and use complex numbers, whose phases are established in $[0, 2\pi]$ along the radius range, instead of integers, in the accumulator array. The idea is that the intersections of gradients that are not of the same circle, will certainly be out of phase and will be canceled, thus reducing the intensity of the background noise in the accumulator. We tested our application to determine if introducing unweighted complex phase coding along the radius range increases the peak signal-to-noise ratio in A.

We denote I the bitmap array of the original grayscale image. The accumulation array A is a matrix of integers of the same size as I , initially set to 0. For each pixel (i, j) of the image I , the gradient direction is computed and a straight line segment Δ_{ij} is drawn in this direction. This segment is discretized in the accumulation array A by the Bresenham algorithm (Bresenham, 1965), resulting in a set of points $\Delta_{ij}^d = \{(k_{ij}, l_{ij}) \in A\}$. In order to optimize this building process, and minimize noise in A , we use the Otsu method (Otsu, 1975) to retain only those gradients with significant module values. Each corresponding element $A(k_{ij}, l_{ij})$ receives an increment ξ_k [see formula (1)], except for the origin of the gradient.

$$\xi_k = e^{2\pi i k/N} \quad (1)$$

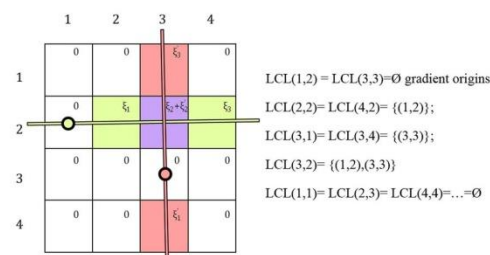


Figure 3. Left: accumulation array values, lines from gradient vector, and gradient origin points (bold circles). Right: corresponding local contributor list (LCL).

where k is the discretized distance index along Δ_{ij}^d and N is the cardinal of Δ_{ij}^d (see Fig. 3).

Local Contributors List (LCL)

A list Local Contributors List (LCL) (k, l) is linked to each point (k, l) of the accumulation array A in the following manner: during the accumulation process, for each point (k, l) , the corresponding list $LCL(k, l)$ is filled with the coordinates of the points (i, j) , (i, j) being the coordinates of the gradient (Δ_{ij}) accumulation source at point (k, l) :

$$LCL(k, l) = \{(i, j) / (k, l) \in \Delta_{ij}\} \quad (2)$$

Used Contributors Matrix (UCM)

UCM is a matrix of integers of the same size as the image. During each iteration, for the maximum value in accumulation array A (a peak), the corresponding LCL is analyzed: at each contributor's coordinates, the UCM cell is filled with the current peak number if not already assigned (see Fig. 5).

Obtaining and processing images

Yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171 were exposed to different levels of osmotic pressure ranging from 1.38 to 16.5 MPa in the presence of glycerol (to adjust osmotic pressure) and nutrients, then sandwiched between a Malassez grid and a coverslip. After 3 min of preparation (to allow yeast sedimentation), yeast cells were visualized by using an upright microscope (AxioPlan 2imaging; Zeiss, Marly le Roi, France) equipped with a black and white camera (AxioCam MR; Zeiss) driven by the AxioVision Rel 4.8.0.0 software (Zeiss). A $\times 63$ objective was used to observe cells. Low-quality images (i.e. blurry images) and images out of focus (i.e., yeasts and Malassez grid were not always in the same focal plane) were recorded. The quality of these images may be related to the presence of glycerol and more particularly to light scattering in the water/glycerol solution as well as to low yeast sedimentation or poor operator ability.

At this point, the images are processed to eliminate noise and brightness anomalies. We remove also the underlying Malassez grid which is a troublesome artefact for cell segmentation and counting in microscopic images (Denimal et al., 2015).

General Overview of the Algorithm

The main loop of the algorithm is presented in Figure 4. Each step will be subsequently detailed.

Building the Gradient Field, the Accumulation Array A and Determining Stopping Criterion (Step 0)

Most of classical CHT implementations use a Sobel filter to determine the edges in I . This filter is efficient on sharp edges, but fails to be accurate in case of fuzzy borders. If cells in the image I are out of focus for any reason, a classical CHT implementation will miss some detections. To avoid this

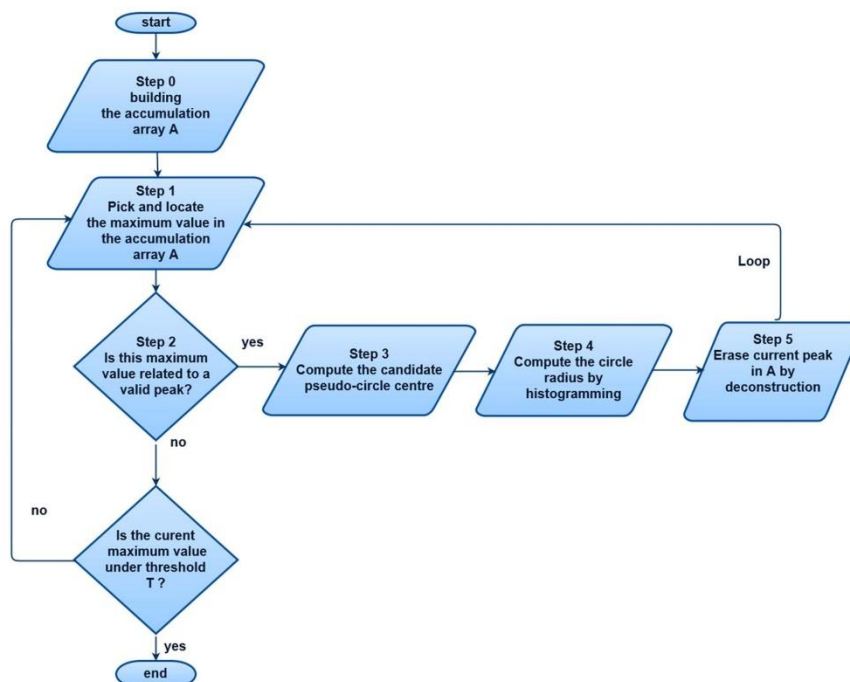


Figure 4. Algorithm main loop.

problem, we propose to use a convolution with a kernel from the first-order derivative of a 2D Gaussian, allowing an improved treatment of fuzzy edges.

From this vector field, we then compute A and $|A|$ as described in section data structures. Using $|A|$ we then determine a stopping criterion T .

In the literature, this threshold T is commonly determined by choosing a percentage of maximum values in the accumulator matrix (Davies, 2004). This may lead to the arbitrary loss of the weakest peaks in the accumulator. We propose a different approach in order to provide an estimation of accumulator background noise, which is not defined *a priori*, but calculated. The main idea here is, that if an accumulator peak exists, the points that have contributed to build it are unlikely to be peak locations. So, accumulator values at these locations should not be characteristic of a peak value. The method is the following: we first select in the LCL all the contributors of the considered peak and retrieve the values of those contributors in the accumulator.

We then compute T , using the interquartile range (IQR): $T = Q3 + W \times \text{IQR}$ where $W = 1.5$ as is common in outlier detection (McGill et al., 1978) and $\text{IQR} = Q3 - Q1$, $Q1$ and $Q3$ are, respectively, the first and the third quartiles of the distribution of $|A|$. Thus, the condition $\max(|A|) < T$ will provide a stop criterion for the main loop.

Picking and Locating the Maximum Value in the Accumulation Array A (Step 1)

Finding the maximum value and its location in the accumulation array $|A|$ is trivial. This maximum defines a peak and, prior to any other analysis, the challenge is to decide if that peak is potentially generated by a circular shape in the original image or is only an artefact.

Validating a Peak by Using UCM (Step 2)

The CHT has accuracy limits when searching for a wide range of radii. A wide range of radii may generate many false positives or missing detections. In its Matlab R2014b[®] implementation, the *imfindcircles* documentation suggests choosing a radius range (measured in pixels) such that

$$R_{\max} < 3 \times R_{\min} \wedge (R_{\max} - R_{\min}) < 100 \quad (3)$$

This can be an issue when searching for circular objects without previous knowledge of their size, for example, in the case of budding cells in yeast microscope images or cells from different species.

Our algorithm does not need *a priori* knowledge of an object's size. It overcomes this limitation, while retaining its accuracy, by the combined use of GAT, LCL, and UCM. It proceeds as follows: for the candidate peak number N

0	1	1	1	0	2	2	2	0
1	0	0	0	1	0	0	0	2
1	0	P_1	0	1	0	P_2	0	2
1	0	0	0	1	0	0	0	2
0	1	1	1	0	2	2	2	0

Figure 5. Used contributor matrix with two peaks P_1 , P_2 , and their contributors $F_1 = 100\%$ $F_2 = 75\%$.

named P_N , a freshness coefficient F_N is calculated as the ratio between the numbers of P_N , contributors having the value N in the UCM, and its total number of contributors:

$$F_N = \frac{\text{card}\{C_N = N\}}{\text{card}\{C_N\}} \times 100 \quad (4)$$

where C_N is the set of contributors of P_N .

As illustrated in Figure 5, the peaks P_1 and P_2 are characterized, respectively, by 100 and 75% freshness.

A peak P_N with a freshness coefficient above 50% is considered as valid and added to the peak list. A peak P_N with a freshness coefficient below or equal 50% is considered as probably linked to a previous peak P_K , $K < N$. This parent peak P_K is that which shares in UCM the maximum number of contributors with P_N . The value UCM (P_N) is then set to P_K .

Accurately Computing the Candidate Pseudo-Circle Center and Its Radius (Steps 3 and 4)

The highest accuracy in calculating the center coordinates is crucial for the future characterization of the circle. As shown in Figure 6, $A(i, j)$ is not always the actual center of the circle we are seeking. In most cases, the geometrical center of the circle does not fall exactly in the center of a pixel. Therefore, the adjacent elements of $A(i, j)$ in the accumulation array contain useful information about the true location of the center. Let $V(i, j)$ be a set of cells in the neighborhood of (i, j) defined as follows:

$$V(i, j) = \{(k, l) / d((i, j), (k, l)) < \delta \ \& \ A(k, l) > \sigma \times A(i, j)\} \quad (5)$$

where δ is the neighborhood radius, d defines the Euclidian distance, and σ is a coefficient of eligibility in the neighborhood. The threshold of σ is defined “experimentally” as that which gives the best performance in our sample. An estimation of the centroid is then computed with a sub-pixel precision by taking the barycentre of the points belonging to $V(i, j)$, weighted by their values in A . In this application, these parameters are set to $\sigma = 0.55$ and $\delta = 2.5$. This calculation step could be related to the update step of the mean shift algorithm as described in Comaniciu & Meer (2002). We do not use the complete iterative process of the mean shift, as we have already found the maximum value pixel in the accumulation array (the feature space).

At this point, we determine the radii of the circles related to this center. We do this by using the information from the merged LCL of the $V(i, j)$. We can therefore compute a

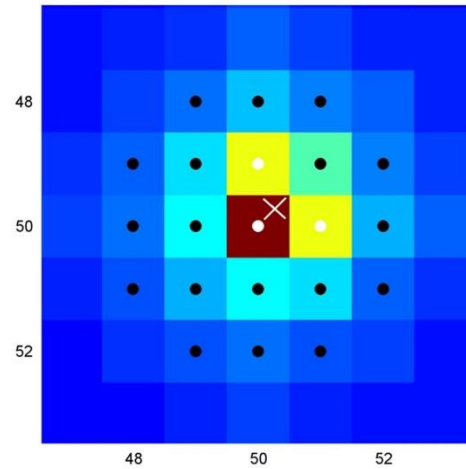


Figure 6. Part of the accumulation array A , the black dots are the neighborhood, the white dots are $V(i, j)$, the white cross is the geometrical center of the circle calculated as the barycentre of the $V(i, j)$.

radial and an angular histogram as described in Kierkegaard (1992) and determine the radii of the circles, even those which are concentric or fragmented.

Erasing Current Peak in the Accumulation Array A (Step 5)

A classical way to erase a local maximum is to define an exclusion zone around the highest peak and continue iteratively until the next peak intensity is below a fixed threshold (Kaytanli & Valentine, 2013, see also, the function *findpeaks* of Matlab).

The method proposed here uses a causal approach: we locally apply the reverse process of accumulation. Namely, the LCL provides all the contributors for each point of A . So, for each contributor (i, j) of the peak at (k, l) to be removed from A , a straight line Δ is drawn along the gradient direction at this contributor's coordinates. This line is digitized in the accumulation array A by the Bresenham algorithm (Bresenham, 1965), resulting in a set of couples $\{(i, j) / (i, j) \in \Delta\}$. Each corresponding element $A(i, j)$ receives a weight decrement equal to its original increment. We call this clean removal process the deconstruction of the accumulation array. Deconstruction involves an additional computation cost, but leads to more accurate detection, particularly in the following cases: two almost concentric circles or a large circle close to a small one as shown in the next section.

RESULTS

Benchmarking the Algorithm on Synthetic and Microbiological Images

In our observations, we identified several difficulties that needed to be overcome in order to count yeast centers

precisely and automatically. We produced synthetic images presenting those typical difficulties and we compared our method with the Matlab® function `imfindcircles` which implements a classic CHT. We are aware that it is possible to adjust `imfindcircles` settings in order to produce very good results, but this requires prior knowledge of the radius range and a fine tuning for each case. Our algorithm does not require such prior knowledge. In the following examples, we systematically apply the same set of parameters to the two methods. These parameters were chosen so that all objects could be found whatever their size.

Budding Cells and Cell Clusters

In this example, Figure 7 represents budding yeasts or cell clusters on which we try to avoid spurious circle detection (Figs. 7c and 7f). Our method provides the exact count (Figs. 7b and 7e).

Object Contrast (Strong versus Weak in the Same Image) and Size Variability

This test image represents either a cell with its nucleus or a small cell in front of a bigger one in low contrast conditions. Our algorithm works by not weighting the vector gradient by its module, and by deep exploration of the accumulation array. The method presented finds both circles (see Fig. 8).

Accurate Separation of Quasi Concentric Circles

The accurate separation of almost concentric circles is important in cell counting applications because the cells may

overlay or touch each other. In this case the proposed method of accumulator deconstruction succeeds in finding both circles (see Fig. 9).

Application to Yeast Counting

Comparison of Performances Between the Algorithm and a Sample of Human Counters

We selected a sample of 13 images in our panel, and aggregated one simulated image, in order to check the conformity of the algorithm (named “Daneel” in Table 1; see Supplementary Material). In total, 14 human counters were involved. A test was first performed for each image, in order to verify the conformity of the “Daneel” scores to the mean of the human counters. As seen in Figure 10, the conformity is verified for all the images (even IM4), the score of the algorithm falling within the 95% confidence interval of the human counting.

Supplementary Material

Supplementary Material can be found online. Please visit journals.cambridge.org/jid_MAM.

A principal component analysis (PCA) was then performed in order to locate the automatic counting among human counts. The graph of counters (Fig. 11, see also the Table 1) shows that there is an important variability between human counters. The complexity of some images (e.g., IM5 and IM12) mainly explains this variability. The main axis of the PCA should be interpreted as the consensus about the

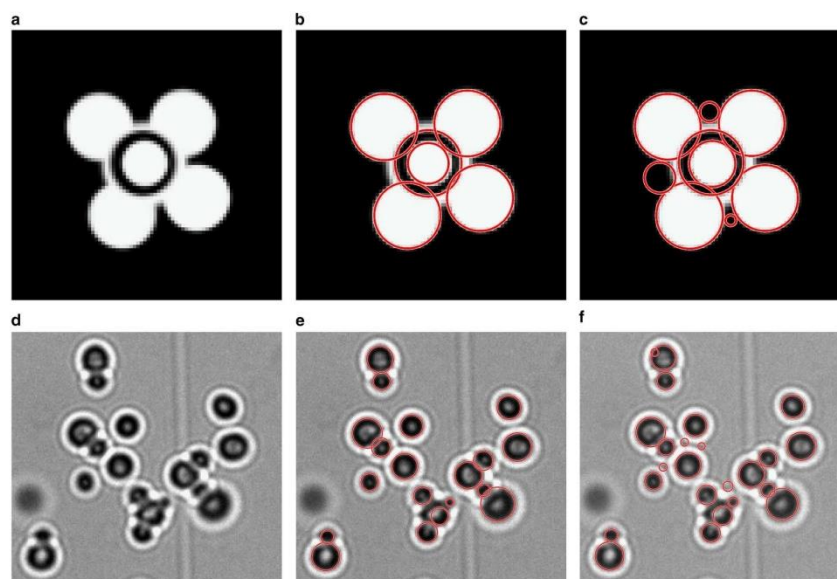


Figure 7. (a) Artificial grayscale image of budding cells and clusters, (d) real image of budding cells and clusters, (b,e) circle detection using our method, (c,f) circle detection using `imfindcircles`.

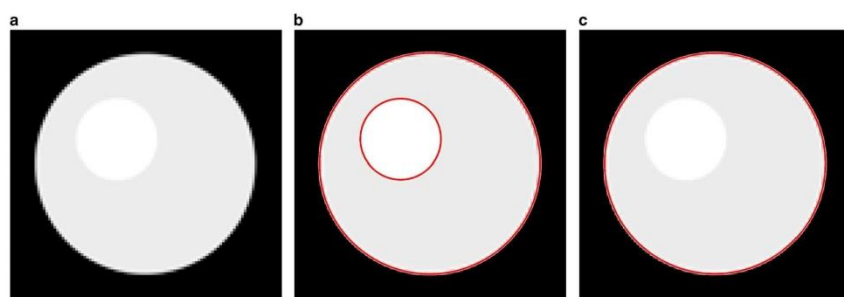


Figure 8. a: Artificial grayscale image with two circles: one with a gray value of 255, the other with a gray value of 235 (b) circle detection using our algorithm (c) circle detection using *imfindcircles*.

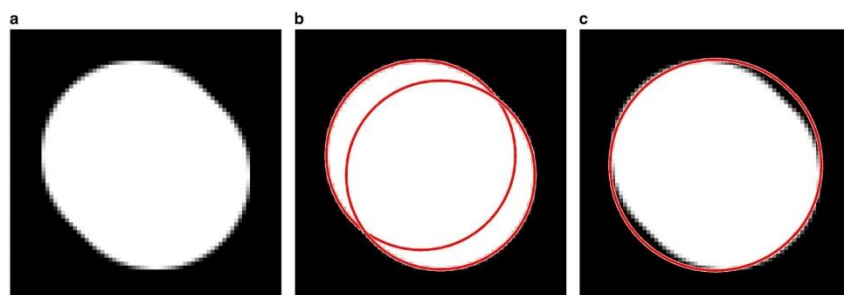


Figure 9. a: Artificial grayscale image with two circles: one centered on x, y , the other one having the same radius at center $x + 5, y + 5$ (b) circle detection using our algorithm (c) circle detection using *imfindcircles*.

number of cells counted. The counters who underestimate the number of cells should be located on the left and those who overestimate, on the right. An interesting fact is that most counters on the right of the figure are non-biologists,

whereas most of the counters on the left of the diagram are biologists, which means that hard scientists are less accustomed to visually rejecting the bodies appearing as artefacts. The performance of the algorithm is located slightly on the

Table 1. Human and Automatic Counting for 13 Selected Images.

Images	Nomenclature ^a	Pablo	Manu	Ambroise	Steph	Chris	Jean	Adrien	Paul	Mélanie	Ludo	Sarah	Alex	Jennifer	Chloe	Daneel
IM1	1.38 R2 1	97	98	95	89	70	109	82	78	82	98	84	98	89	119	89
IM2	1.38 R3 1	85	89	86	59	78	88	79	69	78	85	78	83	71	87	81
IM3	1.38 T1 1	77	78	79	66	75	83	63	61	63	79	66	62	66	84	73
IM4	1.38 T1 3	76	92	88	78	82	88	74	69	74	76	78	75	70	93	63
IM5	10.5 R1 1	64	66	64	56	62	67	63	53	62	66	66	65	64	68	63
IM6	10.5 R2 2	220	242	243	222	228	210	170	152	187	241	205	220	200	222	221
IM7	10.5 T4 1	22	22	24	21	20	22	22	22	22	23	21	21	18	22	21
IM8	10.5 T4 5	44	49	49	46	42	50	42	44	45	54	47	47	43	55	45
IM9	16.5 T4 3	169	176	176	155	150	176	153	165	166	172	162	152	154	176	159
IM10	9 R1 1	234	243	232	211	227	232	207	184	213	236	242	243	210	248	224
IM11	9 R4 2	115	120	130	115	116	130	90	88	98	121	118	98	88	122	115
IM12	9 R4 3	102	108	113	112	105	101	85	90	96	105	104	93	86	105	107
IM13	9 T3 3	314	343	338	287	236	341	264	255	292	292	311	316	275	350	262
Simulation		30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

The last image was obtained by numerical simulation. It was included in the sample only for coherence verification, and was thus not taken into account in the principal component analysis.

^aSee Supplementary Material.

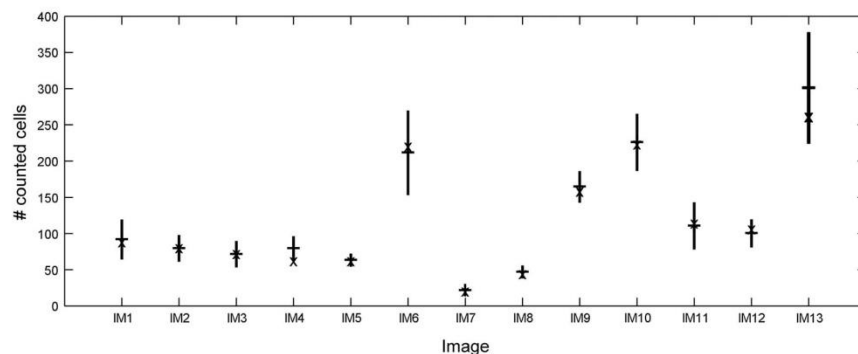


Figure 10. 95% confidence intervals of human counting (lines) and “Daneel” scores (X). The signs plus (+) indicate the means of human counters.

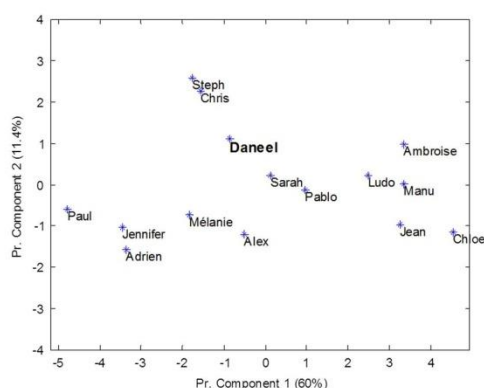


Figure 11. Principal component analysis of human and automatic counting.

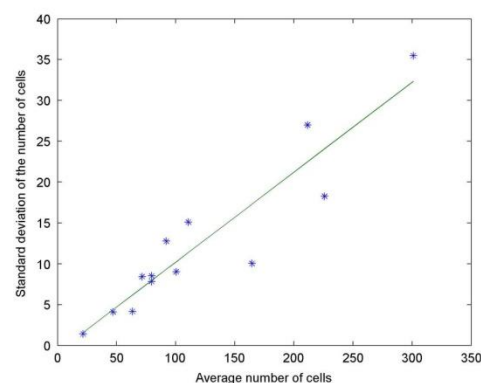


Figure 12. Counted number of cells, standard deviation versus means.

left. The algorithm thus seems to have a “biologist’s” eye, which is a good point. The algorithm appears to be an efficient and reliable compromise to implement automatic counting in a research laboratory.

DISCUSSION

The Issue of Ground Truth

Our experiments show that the ground truth for the number of cells is not a trivial parameter to retrieve. As shown in Table 1 (see also Fig. 10), there exist images where manual counts reach a quite a clear consensus which can be considered as the ground truth. Nevertheless, for some others, this consensus is more disputable. Figure 12 represents the standard deviation of manual counts versus their means. It indicates that, as the standard deviation increases with the number of cells, the consensus becomes less clearly definable.

Daneel Robustness versus Classical CHT (*imfindcircles matlab*[®])

In order to test the genuine robustness of our method versus classical CHT, we performed some tests. Considering the variability of the ground truth, we first chose a synthetic image where the ground truth is known by its construction (18 circles, Fig. 13a). For the choice of a biological image, according to our problematics, we selected from our sample an image with counting difficulties and then cropped an area where it was possible to determine an objective ground truth (35 cells, Fig. 13c). With three different methods, we have then counted for each image the false positives and true negatives then calculated the recall, the precision and the F-Measure.

The first method is our algorithm (called Daneel). The second method is *imfindcircles* with “dark polarity” setting and phase code algorithm. The third method is *imfindcircles* with “light polarity” setting and phase code algorithm.

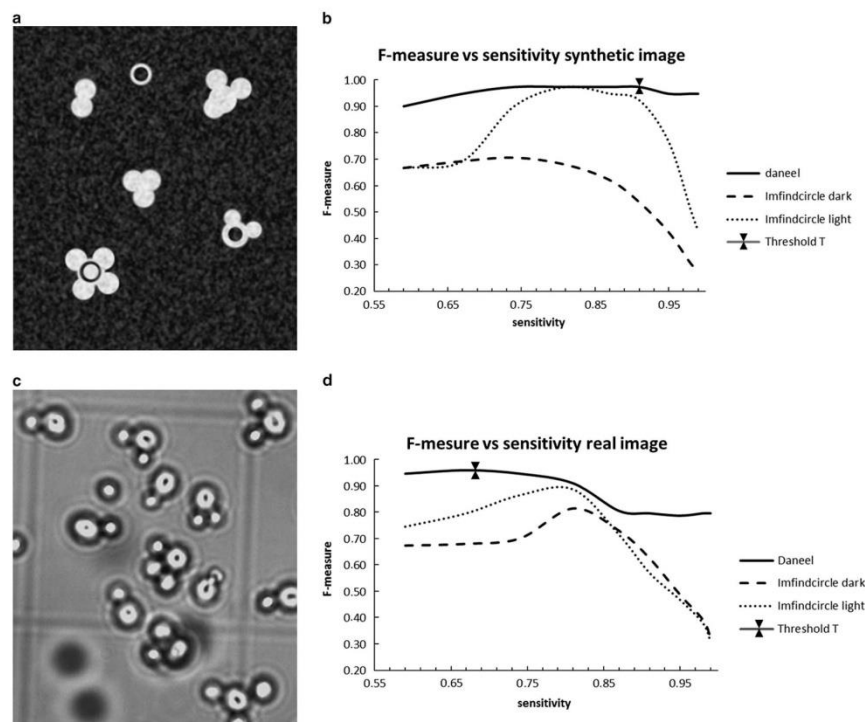


Figure 13. F-measure/sensitivity and the threshold T for (a) synthetic image, (b) quality of circle detection and T evaluation on image (a,c) Microscopic image of yeasts, (d) Quality of circle detection and T evaluation on image (c).

For all methods, we selected a radius range large enough to include all detectable objects. Finally, to measure the influence of the threshold T , we made those countings with T varying from 0.5 to 0.99. We decided to compare with the “phase code” option of *imfindcircles* because in the paradigm, it is very close to our algorithm.

We established the equivalence between our T threshold and the parameter “sensitivity” of *imfindcircles* by the relation in the following equation:

$$\text{sensitivity} = 1 - T / \text{MAX}(A) \quad (6)$$

The results are presented in Figure 13.

By analyzing those graphics, we can notice that:

First, the method Daneel is as good as or better than the other two.

Then, due to UCM, freshness and linkage to previous peaks, Daneel is more robust at high sensitivities and produces fewer false positives. This feature is critical for weak relevant peaks detection (e.g., in the case of images showing budding cells, see Fig. 13c).

Finally the T threshold, determined automatically by using LCL, is always very close to the observed optima (Figs. 13b, 13d).

Iterative Peak Erasing: Relevance of LCL Usage Comparing to Neighborhood Punching (Exclusion Zone)

In the iterative process of peak finding, once a peak has been identified as a relevant one, it has to be erased from the accumulation matrix to allow the search for the next peak. The usual method for peak erasing is to set to 0 the surrounding area. This area can be defined as a square, a disk or by a threshold (e.g., percentage of the maximum peak value). Those erasing methods present a clear advantage in terms of computation speed. Nevertheless, for our applications, there have some major drawbacks. Using a neighborhood punching area is a drawback in case of almost concentric circles which produce close peaks in accumulation matrix. Erasing the neighborhood of the first peak will erase the second one (see Fig. 14 lower row), whereas the deconstruction process does not have this disadvantage (see Fig. 14 upper row). Furthermore, it can be noticed that masking area techniques induce two false positives and a misplaced center. Another example is illustrated by Figure 7, where the accumulation process has generated “ghost peaks” between budding cells. These artefacts are eliminated by the deconstruction method, but not by the classical CHT.

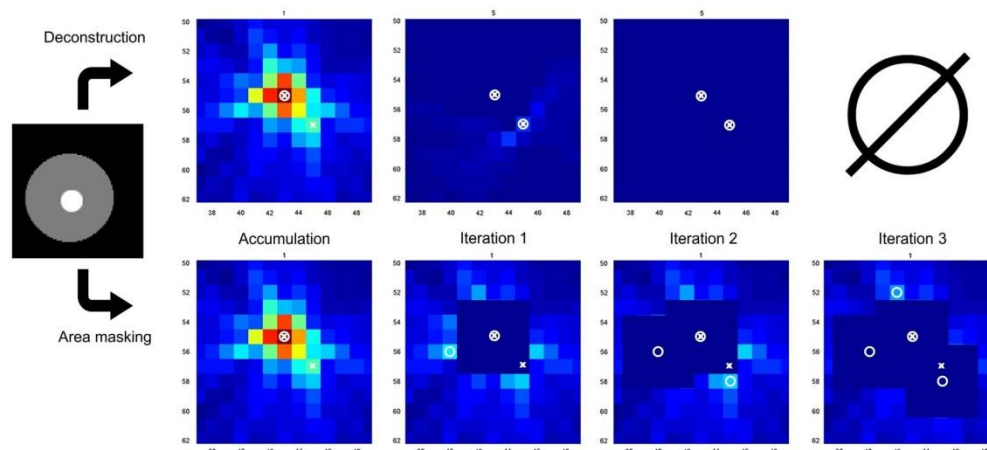


Figure 14. Comparison between deconstruction and masking area methods. White crosses represent actual centers and white circles represent centers found during the iterative process. Empty symbol means that the deconstruction algorithm has terminated.

Computational Considerations

We have established a calculation time estimate [formula (7)] depending on the image size (I), on the number of cells (n), and on the radius range (R):

$$f(I, n, R) = \alpha I + \beta n R^2 + \gamma I n^2 R^2 \quad (7)$$

The constants α , β , and γ depend on the power of the computer. The third term of the equation $\gamma I n^2 R^2$ is mainly induced by the iterative step of deconstruction. Nevertheless, algorithmic shortcuts and optimizations could be obtained by parallelization and/or vectorization of the code. Due to this complementary term, our method is slower than traditional CHT methods. This is a price that seems fair given the gains obtained in robustness and accuracy.

CONCLUSION

In this article, an automatic method for circle detection and counting, based on the Gradient Hough Transform (GHT), was described. The method introduces two data structures to improve robustness and automation of the GHT. An application to yeast cell counting was presented. The method was assessed in comparison with human counting and was statistically proven as reliable as a skilled biologist. We identified one of the method limitations, namely the determination of the T threshold. Further research should therefore be dedicated to a theoretical understanding of the accumulator and to the computation of the best T -value. Other applications deserve consideration as well, we obtained promising results from preliminary tests in the field of viticulture to survey grapes or in microbiology to detect contaminations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Christine Le Noan and Laurence Dumas for promoting the development of this work, and to the DSI/CCUB staff of the Burgundy university for the help on Matlab® software use.

REFERENCES

- ASIMOV, I. (1954). *The Caves of Steel, A Robot Novel*. Garden City, NY: Doubleday.
- BRESENHAM, J.E. (1965). Algorithm for computer control of a digital plotter. *IBM Syst J* **4**, 25–30.
- CAI, Z., CHATTOPADHYAY, N., LIU, W.J., CHAN, C., PIGNOL, J.-P. & REILLY, R.M. (2011). Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting. *Int J Radiat Biol* **87**, 1135–1146.
- CICCONET, M., GEIGER, D. & WERMAN, M. (2015). Complex-valued hough transforms for circles. In *2015 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, IEEE, pp. 2801–2804.
- COMANICIU, D. & MEER, P. (2002). Mean shift: A robust approach toward feature space analysis. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* **24**, 603–619.
- DAVIES, E.R. (2004). *Machine Vision: Theory, Algorithms, Practicalities*. San Francisco, CA: Morgan Kaufmann Publishers.
- DENIMAL, E., MARIN, A., GUYOT, S., JOURNAUX, L. & MOLIN, P. (2015). Reliable Detection and Smart Deletion of Malassez Counting Chamber Grid in Microscopic White Light Images for Microbiological Applications. *Microsc Microanal* **21**, 886–892.
- KAYTANIL, B. & VALENTINE, M.T. (2013). Evolute-based Hough transform method for characterization of ellipsoids. *J Microsc* **249**, 159–164.
- KIERKEGAARD, P. (1992). A method for detection of circular arcs based on the Hough transform. *Machine Vision and Applications* **5**, 249–263.

- KUMAGAI, S. & HOTTA, K. (2012). Counting and radius estimation of lipid droplet in intracellular images. In *2012 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics (SMC)*, IEEE, pp. 67–71.
- LEHMUSOLA, A., SELINUMMI, J., RUUSUVUORI, P., NIEMISTO, A. & YLI-HARJA, O. (2006). Simulating fluorescent microscope images of cell populations. In *IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society*, IEEE, pp. 3153–3156.
- LIU, F., HE, B. & BI, B. (2011). Study on algorithms of graphic element recognition for precise vectorization of industrial computed tomographic image. *Global J Res Eng* **11**, 523–528.
- MCGILL, R., TUKEY, J.W. & LARSEN, W.A. (1978). Variations of box plots. *Am Stat* **32**, 12–16.
- OTSU, N. (1975). A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica* **11**, 23–27.
- RAD, A. A., FAEZ, K. & QARAGOZLOU, N. (2003). Fast Circle Detection Using Gradient Pair Vectors. In *Dicta*, pp. 879–888.
- TAO, Z., JUNJIE, G. & ENXIU, S. (2008). An algorithm for fast circular object detection based on discrete evolutive distribution. In *ISISE'08 International Symposium on Information Science and Engineering*, 2008. IEEE, Vol. 1, pp. 321–324.
- TIMM, F. & BARTH, E. (2011). Accurate, fast, and robust centre localisation for images of semiconductor components. In *IS&T/ SPIE Electronic Imaging*, International Society for Optics and Photonics, pp. 787705–787705–10.

f. Apport des LCL à la détermination du rayon des cercles

Grâce aux LCL, nous avons proposé une approche robuste de détermination des rayons des cercles, qui est une adaptation de la méthode proposée par (Illingworth et Kittler 1987), basée sur l'étude des points de contours dont le gradient pointe vers le centre.

Dans la méthode que nous avons présentée dans (Emmanuel Denimal et al. 2017), nous n'utilisons pas au préalable les détecteurs de contours classiques (Canny, Sobel,...). Nous préférons exploiter tous les gradients significatifs de l'image. Cela donne à l'algorithme une meilleure robustesse dans le cas des contours flous.

i. Calcul du rayon

La liste des contributeurs nous fournit directement les distances au centre candidat. Un histogramme des distances « contributeurs-centre » est établi et normalisé¹⁹. Le calcul du rayon est effectué par l'ajustement de cet histogramme à une loi normale. L'espérance de cette loi donne alors une estimation du rayon du cercle.

ii. Cas des cercles concentriques

Dans le cas de cercles concentriques, nous déterminons le nombre de modes de cet histogramme et nous ajustons le nombre de lois normales requis. Voir Figure 96.

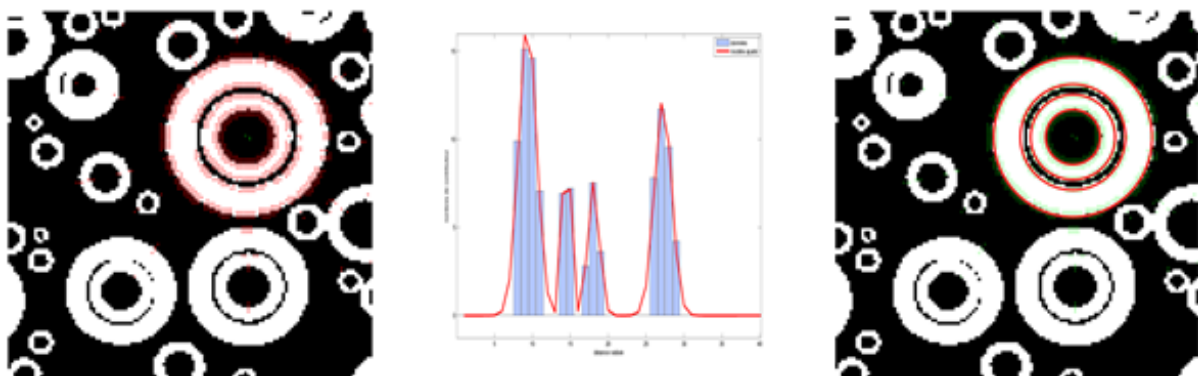


FIGURE 96 CALCUL DE RAYON DANS LE CAS CONCENTRIQUE. A) EN ROUGE, LES CONTRIBUTEURS POUR LE CENTRE 1 B) L'HISTOGRAMME DES DISTANCES RADIALES ET LES LOIS NORMALES AJUSTEES, C) LES CERCLES DETERMINES PAR LES SIGMA DES LOIS NORMALES.

La performance de ce procédé peut être évaluée selon deux critères :

1. Le pouvoir séparateur sur les cercles concentriques
2. La détermination précise des rayons des cercles.

¹⁹ La normalisation s'effectue en divisant les effectifs des classes de l'histogramme par $2\pi r$

L'algorithme est capable de distinguer deux cercles **concentriques** dont les rayons diffèrent de seulement deux pixels comme nous le montrons Figure 96. L'algorithme est capable également de déterminer le rayon d'un cercle même partiellement occulté, et ce jusqu'à une fraction infime de visibilité puisque quelques pixels « contributeurs » suffisent pour ajuster le modèle. Cependant, dans notre application, nous nous imposons une limite empirique en termes de nombre minimum de pixels à prendre en compte, égal à 20% de la valeur de $2\pi R$ pour éviter la surinterprétation des pics, ce qui pourrait produire de faux rayons.

La contrepartie de cette méthode est bien entendu le temps de calcul nécessaire à l'ajustement du modèle multinormales, mais dans notre application, la précision et la robustesse priment sur la vitesse.

g. Apport des LCL à la recherche des pics : problème des conditions d'arrêt

La recherche de pics s'effectue de manière itérative. Le pic de plus forte intensité ayant été traité et déconstruit, la recherche se poursuit *mutatis mutandis* avec l'examen de l'accumulateur dans son nouvel état et le traitement du nouveau maximum. Le problème est alors : quand devons-nous arrêter cette recherche? Autrement dit, quand peut-on dire qu'il n'y a plus de formes circulaires à découvrir dans l'image?

Face à cet écueil souvent éludé dans la littérature et face à nos exigences de robustesse et de fiabilité, nous devons définir de nouveaux critères d'arrêt.

i. Le « niveau plancher » de l'accumulateur (Ground Level)

Nous avons d'abord proposé une méthode basée sur une estimation du niveau « plancher » des valeurs de l'accumulateur.

Les valeurs « plancher » sont celles qui seraient présentes dans la matrice d'accumulation s'il n'y avait pas de forme circulaire dans l'image analysée.

L'idée principale de cette estimation est que **les points qui contribuent à la constitution d'un pic ne peuvent pas être situés eux-mêmes sur le site d'un pic**. En effet un point ne peut pas faire partie du contour d'un cercle et de son centre simultanément. Les intensités localisées en ces points, à quelques exceptions près (exemple d'un cercle dont le centre est sur le périmètre d'un autre cercle), seront donc supposées représentatives du bruit de fond de l'accumulateur. Ce bruit de fond est notamment généré par les éléments de contours présents dans l'image qui ne relèvent pas de formes circulaires.

Grâce aux LCL, nous connaissons les contributeurs du pic de référence (généralement le plus grand) et nous pouvons alors déterminer une valeur du niveau de « bruit » dans l'accumulateur, indépendante des pics. Cette valeur du bruit de fond donnera donc un seuil plancher établi objectivement image par

image et définira le niveau d'intensité en deçà duquel il ne serait pas raisonnable de chercher de nouveaux pics.

Cette estimation de la valeur moyenne normale (hors cercles) de l'accumulateur est basée sur la technique de la boîte à moustache dont les détails du calcul peuvent être vus dans notre troisième article en page 4. Cette technique donne une valeur limite à ne pas dépasser, mais cette approche ne garantit pas que tous les pics supérieurs à cette valeur soient effectivement de « bons » pics.

Les LCL nous apportent plus d'information que nous devons exploiter, mais nous devons également mieux comprendre comment se distribuent les intensités dans la matrice d'accumulation.

ii. Modélisation de la distribution de l'intensité dans un accumulateur

L'analyse fine des données présentes autour des pics dans l'accumulateur de la transformée de Hough linéaire a reçu beaucoup d'attention (Du et al. 2012). Dans (Ji, Chen, et Sun 2011) un opérateur local a même été proposé pour améliorer la recherche des maxima.

Furukawa et Shinagawa ont modélisé la distribution autour du pic (Furukawa et Shinagawa 2003), et comparent la forme réelle du pic candidat avec la forme attendue (butterfly). Nous pouvons aussi citer Atiquzzaman (Atiquzzaman et Akhtar 1995) qui ont également étudié la répartition des votes autour du pic dans la matrice d'accumulation afin de déterminer les points d'extrémité de plusieurs segments colinéaires. Toutes ces études, y compris les plus récentes, s'attachent surtout à décrire l'accumulateur de la transformée de Hough linéaire.

Bien qu'il y ait des similitudes avec un accumulateur de la transformée de Hough circulaire, les résultats de ces études ne sont pas transposables directement dans ce contexte que ce soit dans sa version classique ou bien dans la version par gradient.

Dans le cadre de ce travail, nous avons estimé que, bien que le critère d'arrêt « ground level » donne de bons résultats dans la plupart des cas, il y avait encore des marges de progression sur ce point particulier. En effet, à l'observation, les pics apparaissent comme des points se détachant nettement du fond aléatoire, voir Figure 97.

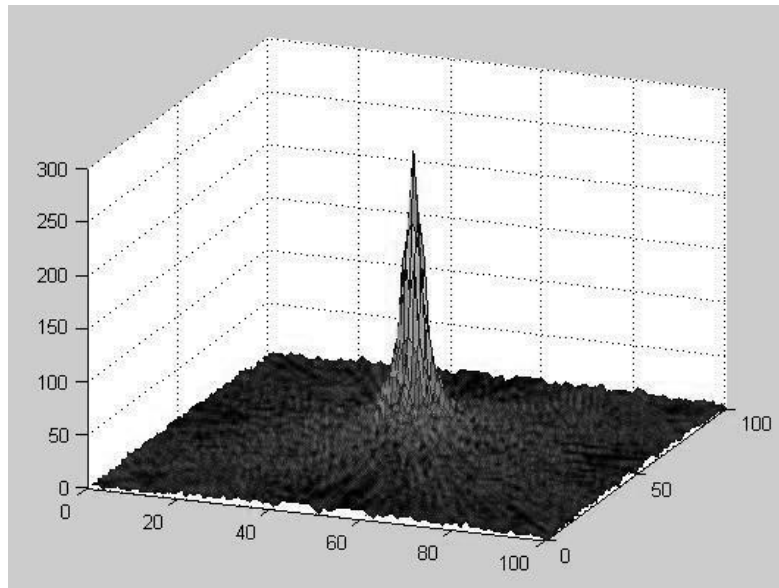


FIGURE 97 PIC EMERGEANT D'UN FOND BRUITE DANS UNE MATRICE D'ACCUMULATION.

Si nous parvenions à caractériser le fond aléatoire, il serait alors possible d'en isoler les valeurs exceptionnelles.

La distribution des valeurs dans la matrice d'accumulation d'une image naturelle sans cercle, correspond à une loi qu'il convient de trouver. Le paramètre « ground level » fournit une solution qui n'est qu'une approximation grossière et synthétique de cette distribution, mais qui est aisément calculable. Une modélisation plus précise de la distribution des valeurs du bruit de fond devrait être effectuée afin de décider si les pics candidats restent dans le cadre de la distribution attendue d'un bruit aléatoire, ou bien s'ils représentent une anomalie statistiquement significative.

Une telle modélisation fournirait, à chaque étape de l'algorithme principal, un seuil minimal de référence permettant de décider si une valeur est aberrante ou non et si les pics restant à examiner sont des candidats potentiels de formes circulaires. Si la valeur du pic est conforme à la distribution, alors cela impliquera l'arrêt des itérations. Cela oblige donc une modélisation précise de la queue de la distribution où figureront les horsains (outlayers).

C'est avec cet objectif que nous avons modélisé la distribution des valeurs du bruit de fond dans l'accumulateur.

iii. Simulation et modélisation.

Nous nous limiterons à l'étude de la transformée de Hough circulaire par gradient (GAT). Pour simuler la distribution des valeurs dans l'accumulateur, nous avons procédé à des tirages aléatoires de segments de longueur 20 pixels dans une matrice d'accumulation de taille 200x200. Les segments tirés au hasard représentent donc les positions potentielles des centres issus d'un point d'émission (point de contour fictif) et orientés selon un vecteur de gradient.

Nous avons alors procédé à un processus d'accumulation classique en incrémentant chaque case de l'accumulateur le long des segments. Nous avons répété ces essais en variant la longueur des segments, la taille de la matrice et le nombre de tirages. Un exemple de jeu de test est présenté Figure 98 A,B,C.

En première approximation, il nous a semblé que la distribution d'une loi normale serait adaptée. En effet il s'agit d'accumuler des phénomènes aléatoires de même ordre de grandeur. Mais des objections sérieuses nous ont conduits à choisir un modèle moins standard pour obtenir un ajustement précis sur le bruit de fond simulé.

Tout d'abord une objection théorique :

- les variables cumulées sont bien du même ordre de grandeur, mais elles ne sont pas indépendantes et cela conduit à une violation du théorème central limite, car seul les points de départ D et d'arrivée A sont indépendants, car déterminés aléatoirement. Les points présents le long du segment dépendent totalement de A et D, ce qui n'entre pas dans le cadre du théorème.

Puis deux objections « expérimentales » :

- La troncature à gauche de la distribution (Figure 98 A), n'est pas représentable avec une loi normale standard.
- L'impossibilité pratique d'ajuster correctement le modèle aux données réelles. Problème rencontré également par (Ji, Chen, et Sun 2011) En effet, tous les ajustements sur une loi normale, même tronquée, que nous avons réalisés, ne sont pas suffisamment précis pour rendre compte de la queue de distribution, ce qui introduit une imprécision dans la décision de l'algorithme d'attribuer à une valeur donnée le statut de horsain.

Ceci nous a conduit à généraliser la loi normale suivant deux axes : troncature à gauche et utilisation d'un exposant réel non forcément égal à 2 dans l'exponentielle (paramètre D). Cette distribution est connue sous le nom de loi normale tronquée généralisée et s'écrit selon l'Équation 17.

ÉQUATION 17

$$\begin{cases} Z = Ae^{-\left|\frac{x-B}{C}\right|^D} & \text{si } x \geq 0 \\ Z = 0 & \text{si } x < 0 \end{cases}$$

Avec A: Facteur d'échelle. B: Facteur de centrage. C: Facteur de dispersion. D: Généralisation de l'exposant.

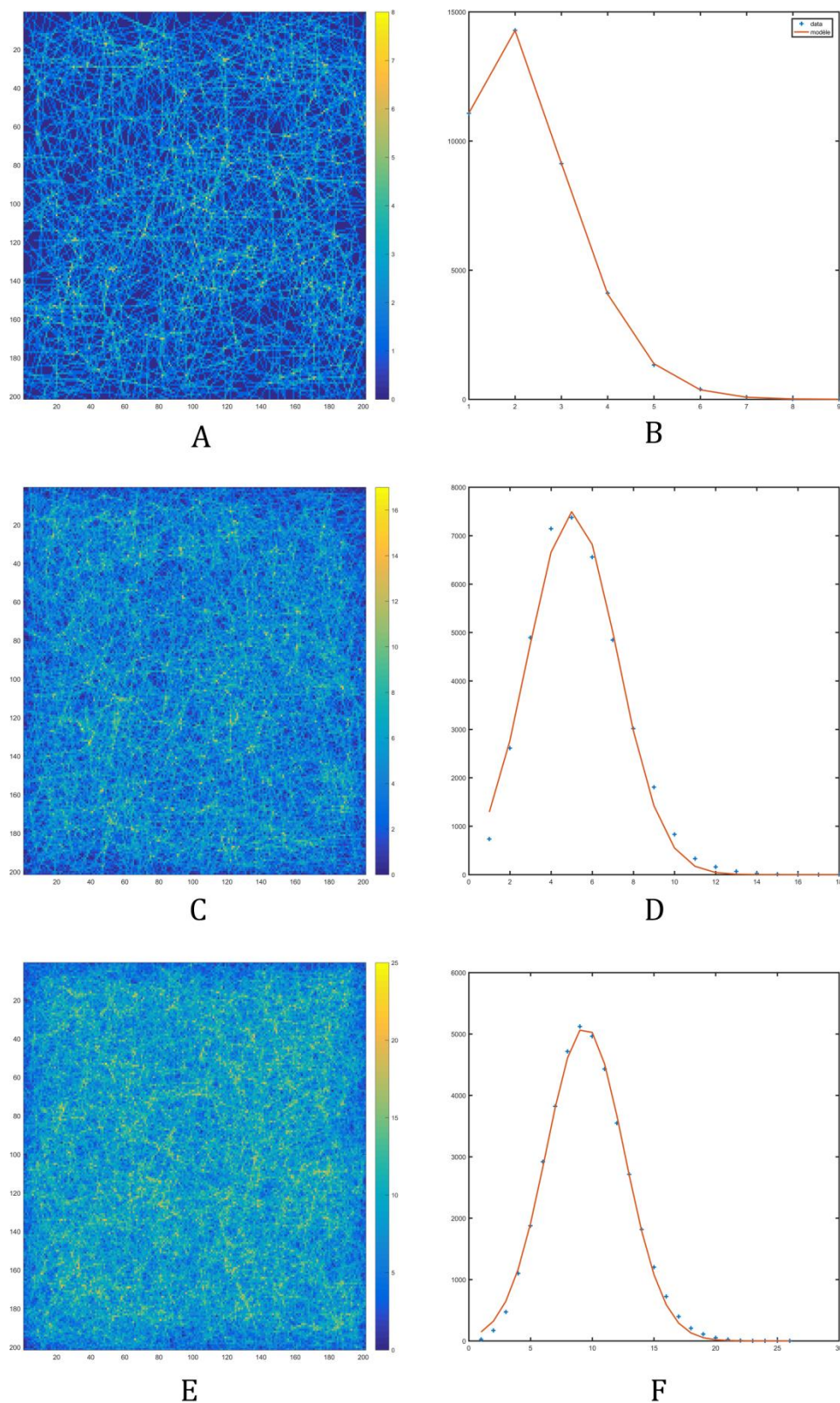


FIGURE 98 SIMULATIONS D'ACCUMULATION ET LEUR DISTRIBUTION DES VALEURS DANS L'ACCUMULATEUR A) ACCUMULATION DE 1500 SEGMENTS, B) DISTRIBUTION DES VALEURS DE LA MATRICE D'ACCUMULATION (CROIX BLEUE) ET MODELE AJUSTE (LIGNE ROUGE), C) ACCUMULATION DE 5000 SEGMENTS, D) DISTRIBUTION DES VALEURS DE LA MATRICE D'ACCUMULATION (CROIX BLEUE) ET MODELE AJUSTE (LIGNE ROUGE), E) ACCUMULATION DE 10000 SEGMENTS, F) DISTRIBUTION DES VALEURS DE LA MATRICE D'ACCUMULATION (CROIX BLEUE) ET MODELE AJUSTE (LIGNE ROUGE).

iv. Utilisation de la distribution pour définir un critère d'arrêt pour l'algorithme.

L'étude de la distribution des valeurs dans un accumulateur présentant des pics potentiellement intéressants (issue d'une image biologique présentant des cellules circulaires), montre une distribution régulière, et des valeurs non nulles situées très loin de la queue de cette distribution, comme nous pouvons le voir sur la Figure 99.

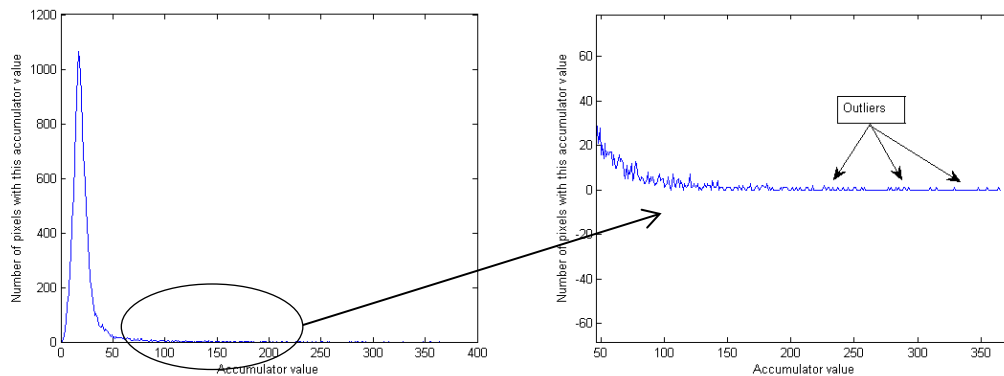


FIGURE 99 OBSERVATION DE LA DISTRIBUTION DES VALEURS DANS UN ACCUMULATEUR. A GAUCHE, LA DISTRIBUTION DES VALEURS, A DROITE, LA QUEUE DE LA DISTRIBUTION OU SE TROUVENT DES HORSAINS (OUTLIERS EN ANGLAIS)

À chaque étape de l'algorithme de détection et de validation des pics, nous effectuerons un ajustement par la méthode des moindres carrés des paramètres de la loi sous-jacente. Voir l'Équation 17.

Ensuite, la valeur minimale pour un pic admissible dans l'accumulateur A est déterminée en utilisant la fonction de distribution cumulative inverse, avec une valeur de probabilité p donnée.

En fait, les valeurs singulières que nous identifions comme des pics potentiellement intéressants ont des probabilités d'occurrence p extrêmement faibles ($<10^{-6}$) dans une distribution aléatoire, de sorte qu'elles peuvent être considérées comme des «valeurs hyperaberrantes». Ce paramètre peut servir de réglage de sensibilité pour la méthode : plus il est grand plus la méthode sera stricte. Cette valeur p a été fixée à 10^{-6} dans notre cas applicatif.

Ensuite, un pic est considéré comme valide si, en ce qui concerne ce critère, il apparaît comme un dépassement vis-à-vis du modèle ajusté. Le pic est alors traité, et déconstruit comme il convient. L'étape de déconstruction est complétée par une phase de réinjection aléatoire des segments déconstruits de manière à ne pas « vider » l'accumulateur et donc à ne pas dégénérer la distribution.

De cette manière plus nous déconstruisons de pics, plus nous convergeons vers une distribution aléatoire « pure », et moins nous trouverons de valeurs aberrantes.

L'algorithme principal s'arrête lorsqu'il n'y a plus de valeurs aberrantes dans la distribution des valeurs de l'accumulateur. La Figure 100 présente l'application de cet algorithme sur une image

particulièrement piégeuse pour la détection de cercle. Notre méthode est comparée à celle disponible dans la ToolBox Image de Matlab qui fonctionne avec une technique classique. Expérimentalement, nous avons fixé le nombre de horsains en dessous duquel l'algorithme doit s'arrêter à six. Il est en effet intéressant de remarquer que la déconstruction d'un pic entraîne la disparition de plusieurs valeurs aberrantes. Ces valeurs se trouvent localisées sur les contreforts et distribuées autour du pic principal. Ce choix est un compromis guidé par la connectivité 8 du pixel et par la fonction de distribution des valeurs autour du pic. En fonction du type d'image, plus ou moins bruitée, contours des cellules plus ou moins nets, ce nombre peut servir à ajuster la sensibilité de l'algorithme.

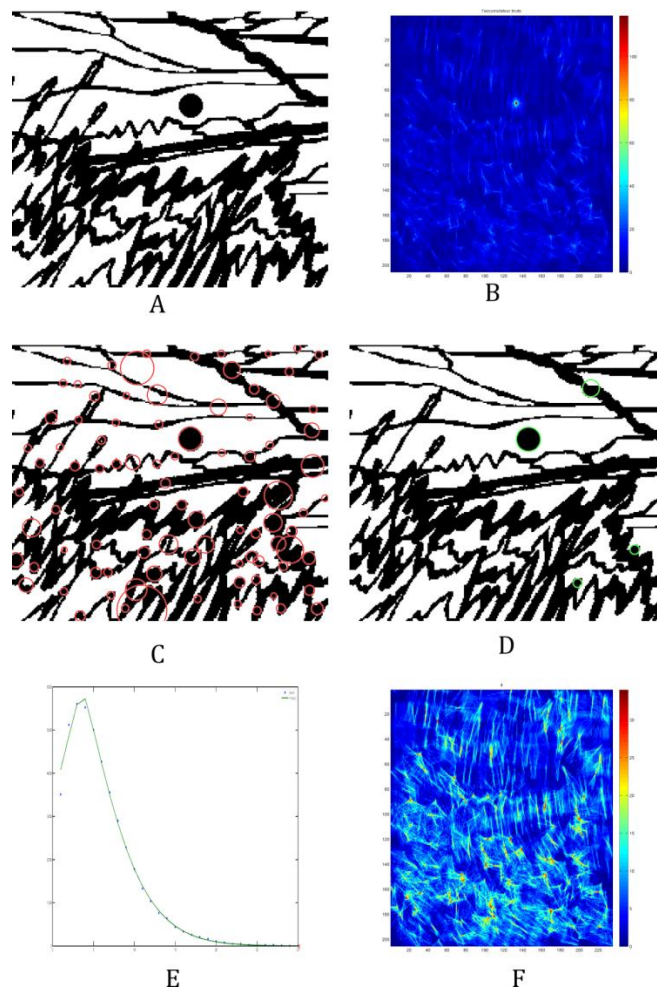


FIGURE 100 DETECTION DE CERCLE ET EFFICACITE DES CRITERES D'ARRETS. **A)** IMAGE A ANALYSER **B)** ACCUMULATEUR BRUT A L'ETAT INITIAL, **C)** 91 CERCLES DETECTES PAR *IMFINDCIRCLE*(CRITERE D'ARRET=SEUIL SUR VALEUR DU PIC MAXIMUM), **D)** 4 CERCLES DETECTES PAR NOTRE METHODE (CRITERE D'ARRET = PROBABILITE SUR MODELE DE DISTRIBUTION), **E)** AJUSTEMENT DU MODELE APRES LA DETECTION DU 4^E PIC, IL N'Y A PLUS D' « OUTLIERS ». (ICI $p=10^{-9}$) LA CONDITION D'ARRET EST REMPLIE, **F)** ACCUMULATEUR APRES LA DECONSTRUCTION DES 4 CERCLES : DES PICS SUBSISTENT, MAIS ILS SONT « STATISTIQUEMENT » NON PERTINENTS.

4. Résultats pratiques: la réponse au problème initial

L'emploi combiné des techniques décrites dans les articles (Emmanuel Denimal et al. 2017; E. Denimal et al. 2015; Marin et al. 2014) permet de réaliser un comptage automatique, fiable et robuste. Le comptage obtenu est en concordance avec celui du consensus d'experts humains de notre panel comme le montre l'analyse en composantes principales présentée voir la Figure 101 et la Figure 10 de l'article (Emmanuel Denimal et al. 2017)). Il est intéressant de noter que dans le panel de compteur humain figurait un groupe de microbiologistes confirmés et un groupe de personnes non biologistes. De l'analyse en composantes principales, il ressort que le groupe de non-biologistes est situé à droite sur le premier axe, c'est-à-dire que ce groupe compte en moyenne trop d'objets tandis que le groupe de biologistes situé au centre et à gauche de l'axe a tendance à compter moins d'objets. Daneel (le nom donné à notre algorithme de comptage) se situe au centre de ce graphique, ce qui indique qu'il compte de manière similaire à celle du panel d'experts biologistes. Il compte sans subjectivité, de manière répétable, et beaucoup plus rapidement qu'un humain. À titre de comparaison, il faut environ 5 minutes à un humain pour compter une lame alors que le programme réalisé pour cette étude caractérise et compte la grille en une vingtaine de secondes. Ce temps dépend bien évidemment de la puissance de la machine sur lequel il tourne et également de l'optimisation du code, qui est perfectible.

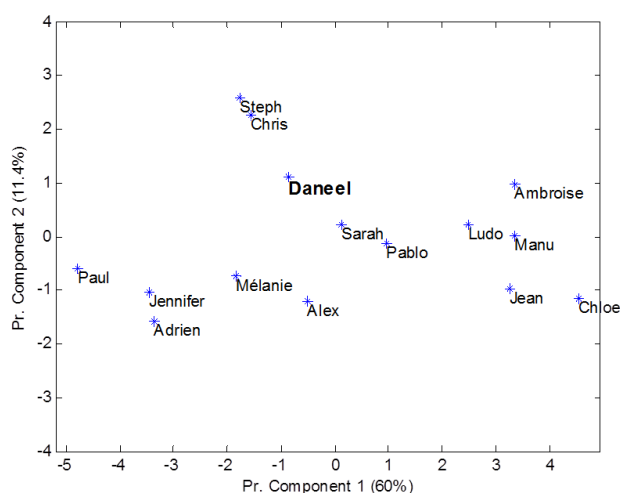


FIGURE 101 ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DES COMPTAGES HUMAINS & MACHINE (DANEEL)

La grille est identifiée et caractérisée, quelles que soient les conditions de bruit, de contraste, de flou ou de rotation avec une très bonne précision. Cela permet de définir correctement la R.O.I. et de réaliser le comptage des cellules incluses dans la zone définie. Cela permet de calculer la concentration cellulaire même dans le cas où le facteur de grossissement de l'image ne serait pas connu. Dans notre cas applicatif, nous ne disposons pas de cette donnée. Le résultat final est illustré sur quatre images issues de l'échantillon de comptage (voir Figure 102, Figure 103, Figure 104 et Figure 105). Ces images

présentent des caractéristiques très différentes en termes de concentration cellulaire, déformation des cellules, bruit de fond, délocalisation, contraste et artefacts. Elles ont néanmoins été traitées avec le même jeu de paramètres sans ajustement manuel, ce qui montre la robustesse du procédé.

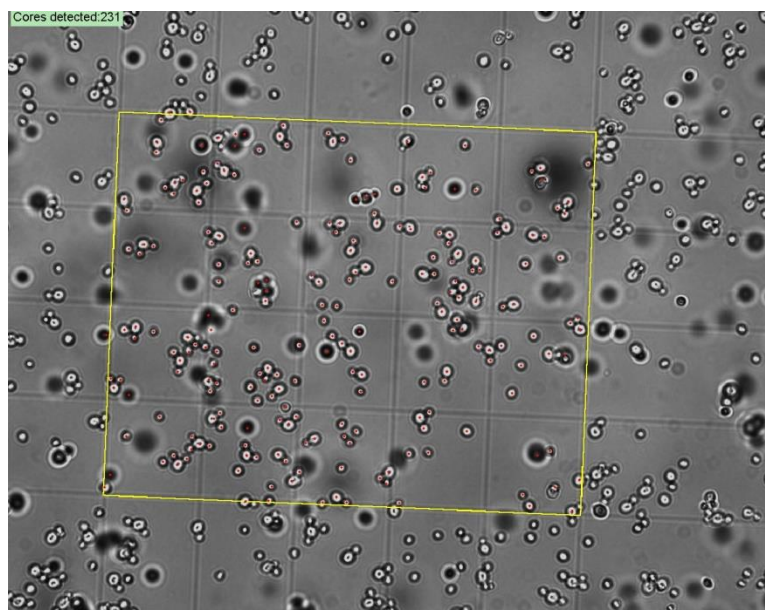


FIGURE 102 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.

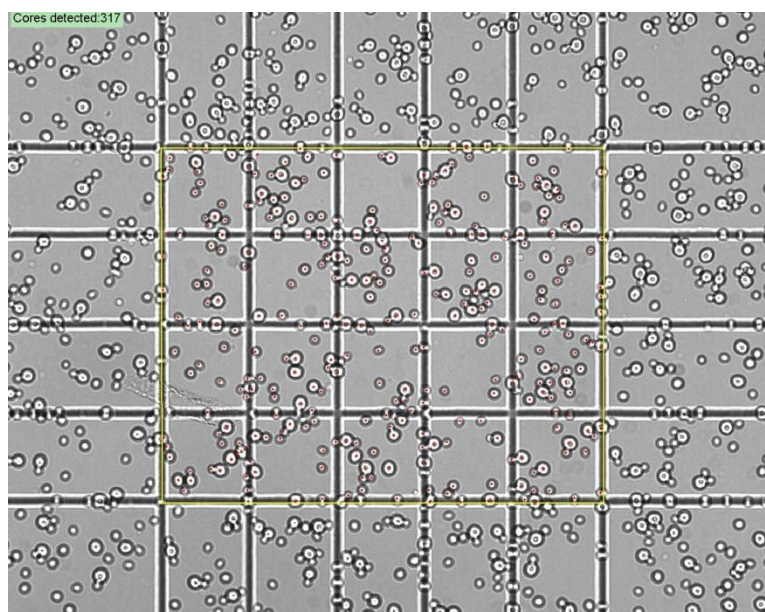


FIGURE 103 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.

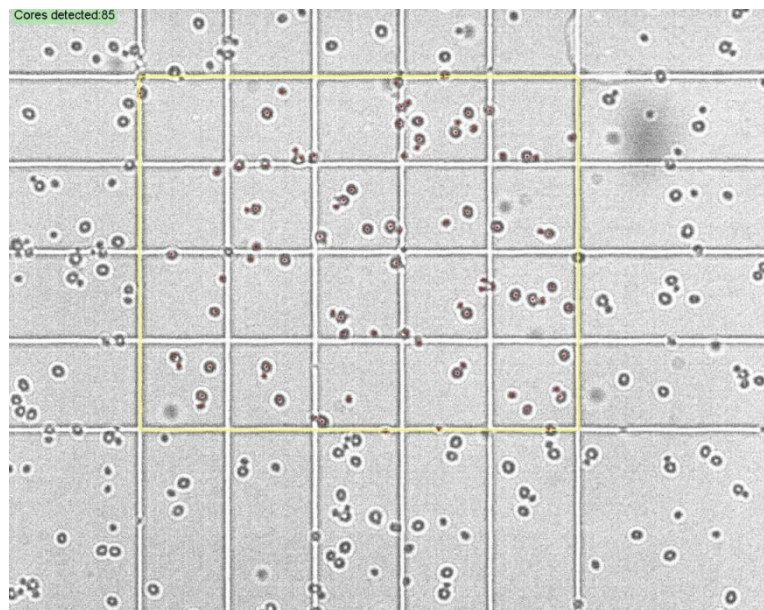


FIGURE 104 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.

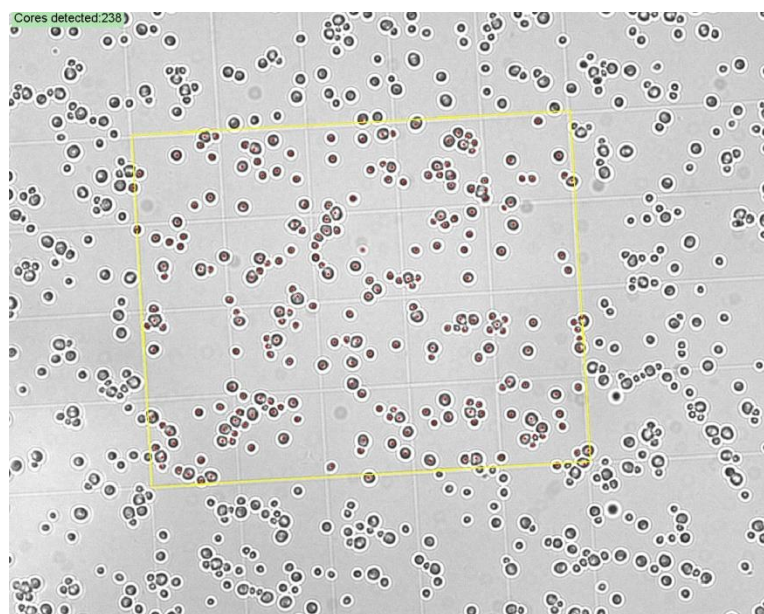


FIGURE 105 IMAGE EXTRAITE DE L'ECHANTILLON DE COMPTAGE, EN JAUNE LA R.O.I. , EN ROUGE LES CELLULES MARQUEES COMME COMPTEES, LE RESULTAT DU COMPTAGE APPARAÎT EN HAUT A GAUCHE.

VI. Perspectives et généralisation aux formes quelconques

CE CHAPITRE PRESENTE UNE SYNTHÈSE DES RESULTATS PRELIMINAIRES OBTENUS DANS LE CAS DES FORMES QUELCONQUES. IL PRESENTE L'UTILISATION QUE NOUS POUVONS FAIRE DES AMELIORATIONS QUE NOUS PROPOSONS POUR LA GAT AINSI QUE LES DEVELOPPEMENTS FUTURS ET LES VOIES DE RECHERCHES OUVERTES.

1. Transformée de Hough généralisée invariante en taille et rotation.

À la suite de nos travaux sur le comptage, nous avons entamé l'étude de reconnaissance de formes quelconques. Dans ce cas, les objets à identifier ne sont plus seulement circulaires, mais peuvent prendre la forme de bâtonnets, d'ovales ou de formes plus exotiques dont les contours ne peuvent pas être décrits simplement. Nous nous sommes donc naturellement intéressés à la transformée de Hough généralisée (GHT Generalized Hough Transform), dont nous avons décrit le principe dans le chapitre «Les concepts généraux, La transformée de Hough généralisée », page 78. Nous avons en particulier étudié si nous pouvions intégrer dans la GHT certaines des améliorations que nous proposons pour la GAT et notamment nos structures de données LCL et UCM.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans le chapitre qui lui est consacré au début de ce document, la version classique de la GHT définit l'angle ϕ par rapport à un axe arbitraire. Dans le chapitre de présentation de la GHT, il s'agit du vecteur \vec{X} (voir Figure 53). Cet ancrage dans le référentiel image est un problème. Il implique de restreindre la recherche aux formes ayant exactement la même orientation que le modèle. Le contournement trivial de cette contrainte se fait alors en explorant à l'aide d'une itération, tous les angles possibles avec la précision voulu au prix d'un coût exorbitant en termes de temps de calcul ou de mémoire.

Le problème de la taille et de la rotation de l'objet à retrouver peut être contourné en se référant uniquement aux propriétés intrinsèques de la forme. La courbure du contour de la forme pourrait être utilisée par exemple. Nous pouvons citer par exemple l'article de De Ma et Chen qui introduisit l'idée en 1988 (De Ma et Chen 1988).

De nombreuses propositions ont été faites dans ce sens dans les années 1990 et un certain nombre d'entre elles sont présentées dans l'article de synthèse de Kassim (Kassim, Tan, et Tan 1999). Pourtant, ce domaine de recherche est toujours actif et l'article de Wei (Wei et al. 2013) ou celui de Yang (Yang et al. 2016) en témoignent.

Ces méthodes tentent toutes de s'affranchir de l'ancrage dans le référentiel image par l'utilisation de propriétés locales invariantes telle que la courbure par exemple.

Les critiques sur l'emploi de la courbure en tant qu'entrée dans la R-table pointent essentiellement sur les problèmes posés si la forme à détecter ne présente pas de courbure comme dans le cas d'un polygone (Kassim, Tan, et Tan 1999).

Ces méthodes sont également dépendantes d'une estimation de la courbure du contour qui est relativement difficile à déterminer avec précision compte tenu de la discrétisation. Nous pouvons noter à ce propos les travaux de Hermann et Klette (Hermann et Klette 2007) qui proposent des solutions performantes ainsi que ceux très complets de Coeurjolly dans sa thèse (Coeurjolly 2002) intitulée « Algorithmique et géométrie discrète pour la caractérisation des courbes et des surfaces » qui propose un calcul fiable de cette courbure en géométrie discrète.

Dans notre approche, nous proposons de circonvenir certains de ces problèmes par une approche originale. Nous nous sommes inspirés de la méthode de Andrew Thomas (Thomas 1992), qui consiste à prendre comme référence non plus l'axe X du référentiel image, mais en alignant l'axe de référence sur le vecteur du gradient en chaque point (Figure 106).

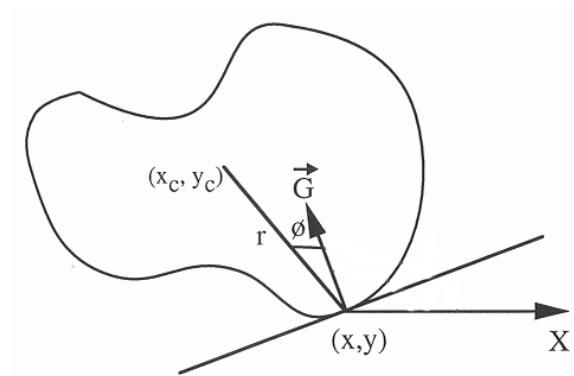


FIGURE 106 ENCODAGE D'UNE FORME HORS DU REFERENTIEL IMAGE

Pour déterminer le nouvel angle ϕ nous déterminons le vecteur gradient \vec{G} en tous points (x, y) . La détermination des paramètres tels que la tangente et la courbure aux points (x, y) est relativement simple, mais la précision est très dégradée (travaux de (Coeurjolly 2002)).

2. Détermination de la courbure en tout point de la forme.

Pour cela nous déterminons d'abord un chemin le long de la courbe à l'aide de l'algorithme de « Moore Neighborhood »²⁰. Ce chemin (graph) nous permet de manipuler les pixels non plus comme des unités indépendantes, mais comme des éléments d'un ensemble cohérent et hiérarchisé. Cela permet d'instituer une relation d'ordre, un début et une fin (Figure 107).

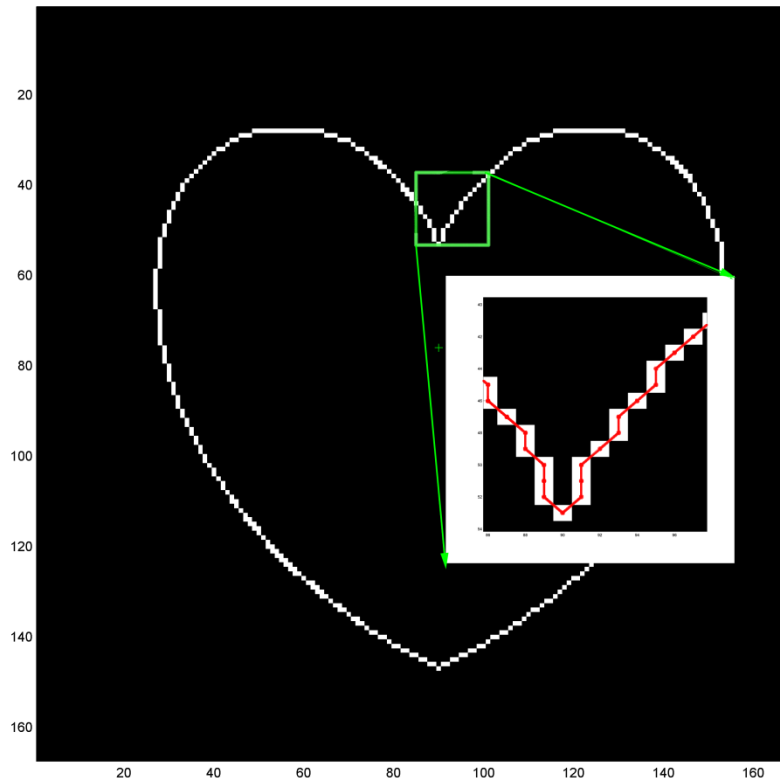


FIGURE 107 GRAPHE SELON MOORE NEIGHBORHOOD. EN ROUGE LA TRACE LE LONG DES PIXELS COMPOSANT LE CONTOUR DE LA FORME, UN GRAPHE DE MOORE.

Nous lisons ensuite ce chemin à l'aide d'un filtre basé sur l'algorithme de Savitzky-Golay (Savitzky et Golay 1964) et nous en extrayons les dérivées successives afin de calculer la courbure en tout point x, y selon la formule ci-dessous :

$$Curvature = \frac{x'y'' - x''y'}{(x'^2 + y'^2)^{3/2}}$$

²⁰ https://en.wikipedia.org/wiki/Moore_neighborhood

La courbure d'une courbe discrétisée ainsi calculée n'est pas optimale (Coeurjolly 2002), et nous en sommes conscients, mais cela ne présente pas de difficulté pour notre application, car nous ne cherchons pas réellement à déterminer une courbure qui soit strictement juste, mais plutôt à utiliser cette approximation de la courbure à la manière d'une signature propre à chaque forme. La représentation graphique de la valeur de courbure obtenue est visible dans la Figure 108.

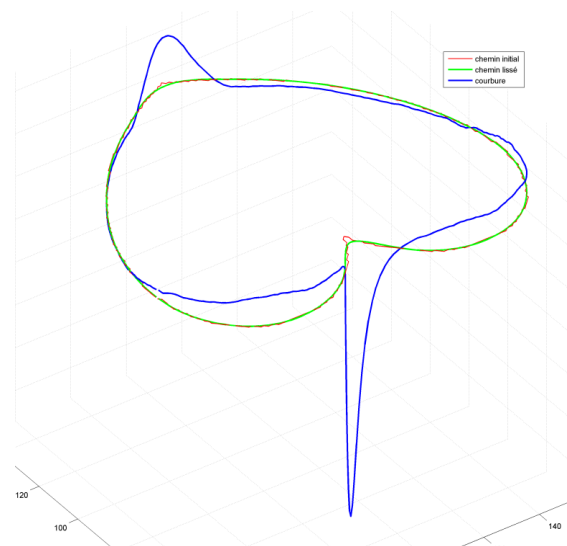


FIGURE 108 REPRÉSENTATION 3D DE LA COURBURE (BLEU) DE LA COURBE LISSEE (VERT) ET DU CHEMIN INITIAL (ROUGE) D'UNE FORME « CŒUR »

3. Construction d'une nouvelle R-Table

La plage de valeurs décrite par les courbures obtenues est alors découpée et quantifiée en autant d'intervalles que l'exigera la précision souhaitée. Ils serviront de points d'entrée dans la R-Table. La R-Table est alors construite en stockant pour chaque courbure ainsi quantifiée, l'angle ϕ et la distance r entre le point (x,y) et le centre de la forme. L'entrée de la R-Table n'est plus alors l'angle entre l'axe X et le vecteur pointant vers le centre, mais la courbure elle-même. La lecture de la R-Table ainsi créée pour un point P et sa courbure C s'effectue comme suit :

Pour chaque valeur de courbure C , il y a N_c centres possibles chacun étant respectivement positionné à la distance R_N et avec une déviation de ϕ par rapport au vecteur gradient \vec{G} au point P . Il suffit alors d'incrémenter les cases ainsi adressées dans la matrice d'accumulation comme pour toute les transformée de Hough. Les formes ayant la même « empreinte » de courbure/distance accumulent ainsi beaucoup plus de valeurs que les formes ayant un profil différent et cela conduit à la détection de la forme par exploration de la matrice d'accumulation.

a. Objection de la courbure constante

Pour les formes à courbure constante comme les cercles, une seule entrée sera présente dans la table et cette entrée contiendra tous les angles possibles pour la distance R . Cela est très exactement ce que ferait la transformée de Hough circulaire.

b. Objection de la courbure nulle ou infinie : Cas des polygones.

Dans ce cas particulier, nous exploitons à notre avantage une « faiblesse » de l'algorithme de lissage de (Savitzky et Golay 1964). Il s'agit plus exactement d'une caractéristique liée au lissage à fenêtre glissante. Quand nous soumettons un contour polygonal à l'algorithme de lissage, nous observons que la courbe produite (en vert sur la Figure 109 image de gauche) génère une courbure positive et négative au niveau des sommets. Si cela se révèle faux théoriquement, cela est en revanche très bénéfique pour notre méthode car nous exploitons la courbure ainsi produite artificiellement pour pouvoir décrire ce type d'objet polygonal en termes de couple courbure/distance (Figure 109 image de droite).

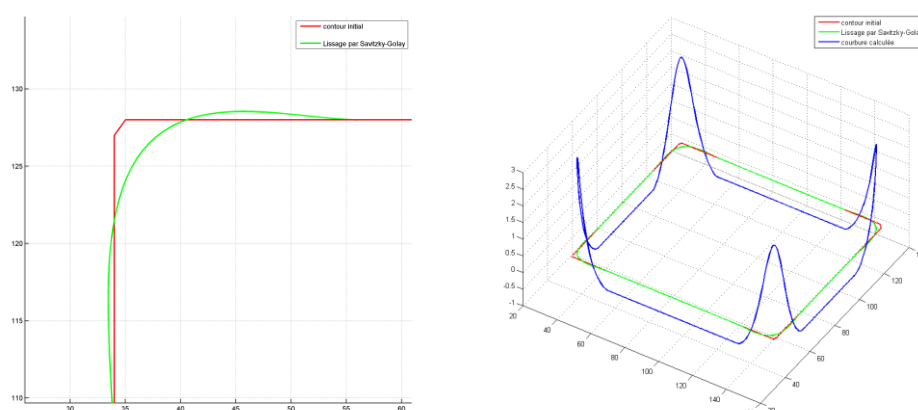


FIGURE 109 LE LISSAGE DE SAVITZKY-GOLAY. À GAUCHE EN VERT, APPARITION UNE COURBURE ARTIFICIELLE, A DROITE EN BLEU, REPRESENTATION 3D DE CETTE COURBURE.

c. Le problème de l'échelle.

La taille de l'objet à détecter est déterminée en comparant le grand axe de l'ellipse englobant la forme modèle avec celui de l'objet à examiner. Ce ratio sert ensuite à modifier la distance R du facteur adéquat. Ce procédé fonctionne correctement pour un coût minimal, mais il peut être pris en défaut si plusieurs formes se chevauchent.

d. Premiers résultats

1. Afin de valider et d'étudier la pertinence de ces concepts, nous les avons implémentés dans une application expérimentale. Ce programme fonctionne en deux temps.
2. L'apprentissage de la forme modèle.

3. La recherche du modèle dans l'image.

Nous avons produit une image synthétique contenant différentes formes géométriques. Parmi ces formes, nous avons recherché un pentagone et un cœur présent dans l'image avec différents facteurs d'échelle et de rotation. L'application produit un espace de paramètre où il apparaît des pics se détachant très clairement du bruit de fond. Les pics correspondent bien aux formes recherchées, quelle que soit l'échelle ou le facteur de rotation. À l'heure de la rédaction de ce manuscrit, nous n'avons pas poussé notre recherche plus en avant sur ce sujet, mais les résultats préliminaires sont encourageants, voir Figure 110 et Figure 111.

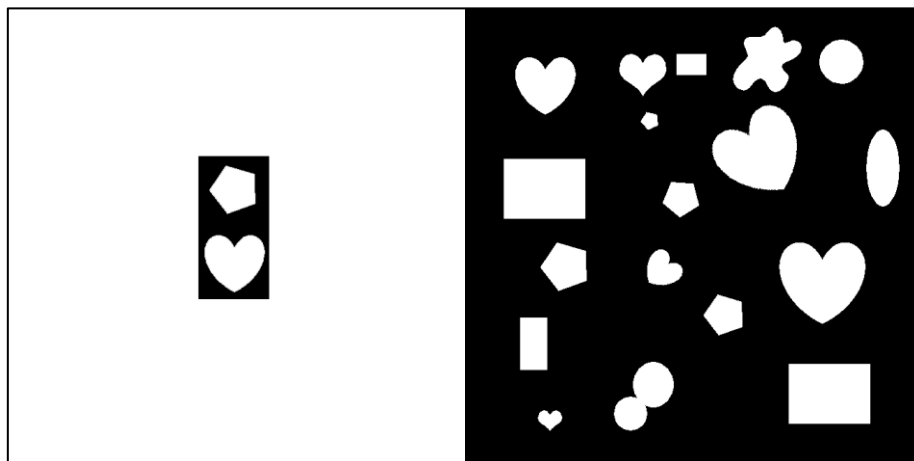


FIGURE 110 RECHERCHE DE FORMES QUELCONQUES. À GAUCHE LES DEUX FORMES A RETROUVER, A DROITE, L'IMAGE A EXPLORER.

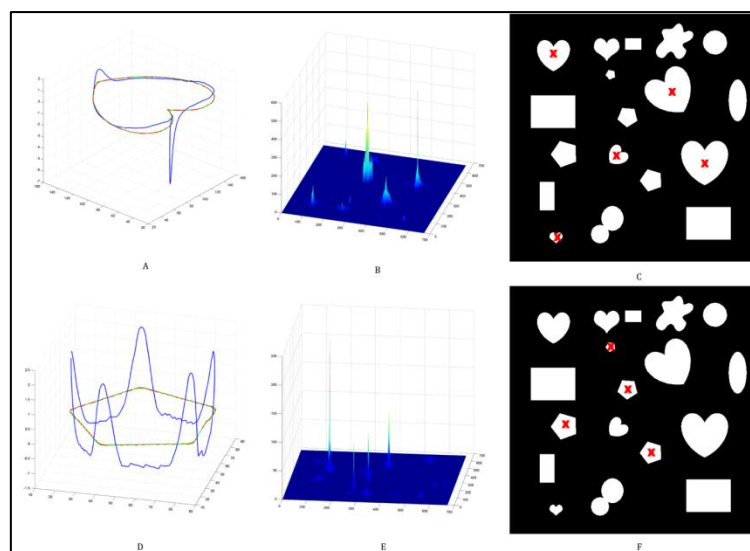


FIGURE 111 RESULTATS DES RECHERCHES DES DEUX FORMES : A) ET D) LES PROFILS DE COURBURE B) ET E) LES MATRICES D'ACCUMULATION, C) ET F) LES POSITIONS DES PLUS GRANDS PICS EN SURIMPRESSION DE L'IMAGE ORIGINALE.

VII. Conclusion et perspectives

Rappel du contexte.

Le travail de cette thèse s'est inscrit dans une large problématique à la croisée de deux mondes : celui de la microbiologie et celui du traitement d'image. De façon plus précise, les laboratoires de microbiologie travaillant avec des cultures cellulaires éprouvent en communs le besoin d'extraire les informations qualitatives et quantitatives des images microscopiques. Ce travail d'extraction doit se faire au moindre coût tant sur le plan humain que financier. L'information extraite doit être qualitative : elle doit apporter des connaissances sur la forme et la diversité des cellules. Elle doit également être quantitative en permettant le dénombrement des populations cellulaires.

Dans notre laboratoire, l'activité de recherche est centrée sur la maîtrise de l'activité et de la fonctionnalité de microorganismes soumis à différents types de stress environnementaux physico-chimiques et biologiques d'amplitude et de cinétique variées dans le contexte de procédés industriels. Tous les secteurs agroalimentaires sont concernés par ces recherches qui visent à optimiser la production et la conservation des microorganismes d'intérêt afin d'optimiser leur mise en œuvre dans les procédés biotechnologiques, ou à l'opposé détruire les microorganismes d'altération ou pathogènes indésirables dans ces filières.

La genèse de la problématique.

À l'origine de ces travaux, il y a l'expression du besoin simple de Stéphane Guyot, chercheur du laboratoire PMB, de procéder à des comptages sur grille de Malassez. Il étudie la résistance au stress osmotique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les conditions expérimentales qu'il a mises en place pour provoquer ce stress osmotique mettent en jeu des solutions contenant de grandes quantités de glycérol. Pour effectuer les dénombrements de population microbienne nécessaire à sa recherche, il peut utiliser des appareils de dénombrement cellulaire classique. Or, le glycérol rend les milieux de culture visqueux et avec de telles conditions expérimentales l'usage de ces appareils est exclu. La viscosité du milieu de culture rend son pompage dans les circuits de microfluidique impossible. Stéphane Guyot dispose d'un matériel expérimental constitué de plus d'une centaine de lames à examiner présentant des qualités d'acquisition très variables et si le comptage manuel est réalisable, il est lent, fastidieux et non répétable. Il s'adresse alors à l'équipe de la cellule d'appui aux utilisateurs, à l'enseignement et à la recherche d'AgroSup Dijon. Au sein de cette petite équipe que j'anime, nous avons certaines compétences en traitement d'image et en informatique.

Stéphane Guyot nous expose son besoin : saurions-nous compter automatiquement les cellules de levures sur ses images de lames de Malassez ? Au premier abord, nous pensons tous qu'il s'agit d'un simple problème d'ingénierie et que quelques heures de travail suffiraient à résoudre la question

posée. Mais à y regarder de plus près, et au vu de la complexité et de l'hétérogénéité des images, il s'avère rapidement que les méthodes de traitement d'images simples vont échouer et les contraintes de **robustesse** et de **fiabilité** viennent s'ajouter à celle de l'**automatisme**.

Au cours des mois suivants, nous étudions et essayons des techniques de plus en plus avancées dans le domaine du traitement d'image. Ces travaux nous amènent à nous poser des questions qui dépassent le cadre applicatif initial. Le véritable travail de recherche commence. Pour appréhender ce sujet, nous choisissons de décomposer le problème initial en deux parties : l'une concernera la détection et la caractérisation de la grille, l'autre partie s'attachera à détecter et comptabiliser les cellules que nous assimilerons à des formes pseudo-circulaires. Fort de cette stratégie, nous étudions les transformées de Fourier bidimensionnelles, les transformées de Hough linéaire, circulaire, par gradient et les morpho-mathématiques. Cela constituera l'état de l'art sur lequel nous appuierons nos travaux.

À propos de la grille :

La détection et la caractérisation de la grille sont des étapes permettant de définir la zone d'intérêt à l'intérieur de laquelle il faut compter les cellules. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé les propriétés périodiques de la géométrie de la grille. À l'aide d'une transformée de Fourier discrète bidimensionnelle (DFT 2D) de l'image, nous avons mis en évidence la trace de la grille dans l'espace des fréquences. L'identification de cette signature a été réalisée dans l'espace des fréquences de la DFT 2D à l'aide d'une transformée de Hough linéaire. L'extraction de ce signal a permis deux choses. La première a été de caractériser la grille en tant qu'objet mathématique (ensemble de droites aux équations connues) et ainsi définir la zone d'intérêt à l'intérieur de laquelle établir le dénombrement cellulaire. La seconde a été l'élaboration d'un filtre qui permette l'effacement de la grille dans l'espace image de façon à simplifier le travail de segmentation des cellules. Travailler dans le domaine fréquentiel apporte une grande robustesse et la méthode est peu sensible aux conditions de prise de vue. L'originalité de cette approche et les résultats ont été présentés dans deux articles. (Marin et al. 2014) (E. Denimal et al. 2015).

À propos des cellules :

Le comptage des cellules semble être la partie triviale du problème, mais en réalité, la complexité de la question vient de la détection des cellules et non de leur dénombrement. La forte variabilité de la dynamique et des contrastes dans les images à traiter nous ont orientés vers des techniques de reconnaissance de forme de type transformée de Hough circulaire. L'aspect circulaire des levures étant parfois discutable, il nous a fallu constater l'insuffisance des méthodes classiques pour notre application. Nous avons alors introduit dans la transformée de Hough circulaire par gradient des

modifications qui offrent des possibilités inédites. L'introduction de la Liste de Contributeurs Locaux (LCL) permet de déconstruire les pics formés dans l'espace des paramètres de la transformée de Hough circulaire ce qui permet une meilleure précision et une plus grande robustesse. L'introduction d'une matrice de contributeurs des pics déjà utilisés (Used Contributors Matrix) ajoute de la précision en réduisant le nombre de faux positifs en écartant les pics non pertinents. Les images filtrées (sans grille) sont alors traitées à l'aide de cette transformée de Hough par gradient modifié. Les résultats obtenus permettent des comptages en accord avec le consensus d'un panel d'expert ayant examiné un échantillon représentatif du lot d'images. À ce stade, les objectifs du problème initial sont atteints : la méthode décrite permet de compter les lames de Malassez de manière fiable, répétable, robuste, et totalement automatique. Ces travaux ont été publiés dans un article. (Emmanuel Denimal et al. 2017). Ce travail a également permis aux microbiologistes d'exploiter leur matériel expérimental ! Ils ont pu grâce aux données obtenues avec les outils de comptage que nous leur avons fournis, conclure leurs propres recherches et publier leurs résultats de leur côté.

À propos de la vérité de terrain :

L'analyse des résultats et la confrontation avec le panel d'experts ont mis en lumière le problème de la vérité de terrain et de la subjectivité de l'expert. Lors de la rédaction de l'article (Emmanuel Denimal et al. 2017), nous avons eu des échanges avec les rapporteurs au sujet de cette vérité de terrain. Nous pensons que l'évaluation de la qualité de la détection est relative à l'application cible et donc subjective. Dans le domaine étudié, il n'existe pas de vérité terrain clairement définie et même si nous la créons, elle reste discutable, car le consensus des experts n'est pas toujours bien défini.

Une comparaison de point de vue sur l'échantillon que propose Cicconet (Cicconet, Geiger, et Werman 2015) est un exemple de la relativité de la vérité de terrain. Sur la Figure 112 ci-dessous nous pouvons constater que l'algorithme de Cicconet détecte la cellule embryonnaire dans le centre de l'image de manière très précise malgré les difficultés que présente l'image. Notre algorithme, dans cette situation, détecte plus de formes circulaires, car lors de ce test nous n'avons pas introduit de critère de taille. Les deux algorithmes ont leur propre « vérité » qui dépend de l'application cible. Cela rend la comparaison non pertinente en dehors d'un contexte précis. Cherchons-nous des cercles ou des embryons ? La sémantique de ce que nous cherchons est essentielle : chercher une cellule embryonnaire n'est pas comme chercher un cercle même si la cellule embryonnaire est de forme pseudocirculaire. L'avis de l'expert est bien sûr primordial, mais comment trancher si la machine le contredit ?

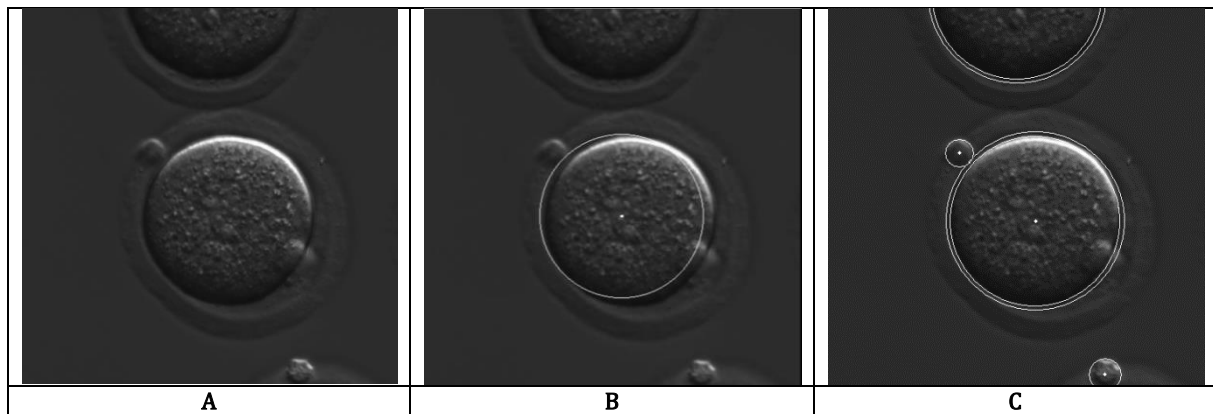


FIGURE 112 A) ORIGINAL FRAME3 FROM CICCONET DATASET E00, B) CIRCLE DETECTION ON FRAME3 E00 EXTRACTED FROM CICCONET'S MOVIE, C) OUR CIRCLE DETECTION ON FRAME3 FROM CICCONET'S DATASET E00

Dans cet autre exemple, la Figure 113 montre une image extraite de notre jeu de données. Les points rouges indiquent les « bonnes cellules » et définissent ainsi la vérité de terrain vue par les experts. Nous constatons cependant qu'il existe encore six ou sept objets circulaires qui ne sont pas reconnus comme des cellules par les experts, mais qui semblent susceptibles d'être détectés par n'importe quel bon algorithme de détection de cercles. Quid de ces formes circulaires ? Ne sont-elles pas des cellules hors du champ focal qui n'ont pas encore eu le temps de sédimenter ? Ne sont-elles pas des poussières dans le champ optique ?

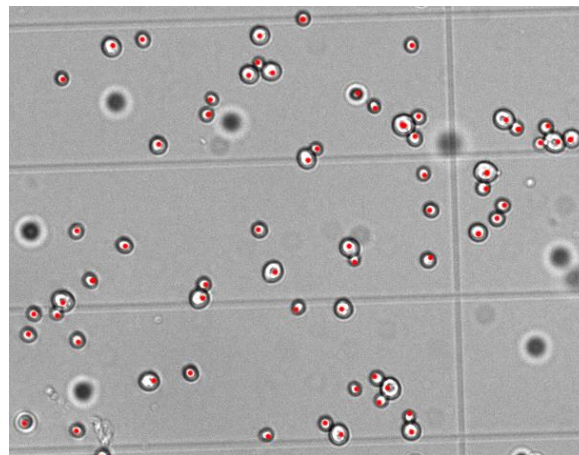


FIGURE 113 VERITES DE TERRAIN ET LA SUBJECTIVITE DE L'EXPERT.

La question du sens que nous abordions en introduction apparaît clairement ici. Il y a une différence entre chercher des cellules et des cercles ! Le concept de cellule est pour l'expert bien plus complexe que celui de forme pseudocirculaire et aussi bien plus difficile à appréhender pour la machine.

À propos des critères d'arrêts.

Au-delà de l'aspect sémantique, jusqu'à quel degré de déformation pouvons-nous considérer qu'un objet est un cercle ? Jusqu'où devons-nous chercher des signatures de cercles dans l'espace des

paramètres ? Ces questions trouvent une partie de leurs réponses dans l'établissement des critères d'arrêt. L'approche classique basée sur la fixation d'un seuil montre rapidement ses limites dans les cas présentant des cercles de rayon variable ou des cercles partiellement occultés. L'ébauche de l'approche statistique que nous avons présentée mérite d'être approfondie. Nous devons poursuivre nos recherches dans ce sens et nous avons déjà pris des contacts avec nos confrères statisticiens pour établir des principes théoriques solides concernant l'étude et la modélisation du processus d'accumulation. Les bénéfices attendus pourraient concerner toutes les méthodes basées sur le concept d'accumulation. Nous espérons aboutir à la publication d'un article sur ce sujet dans l'année à venir.

Intérêt pour l'industrie.

Pour les applications industrielles visées par ces recherches, le laboratoire PMB réalise de nombreux contrats de recherche avec des entreprises en partenariat avec Welience, filiale de transfert de l'Université de Bourgogne SATT –Grand EST. Pour ce projet en particulier, des contacts ont été pris et les démarches pour évaluer l'intérêt industriel de cette méthode de comptage automatique sont en cours au moment de la rédaction. Parallèlement, un fournisseur de matériel de laboratoire allemand a pris contact avec nous pour comparer notre technique avec son propre logiciel développé en interne.

Quid des formes complexes ?

Au vu des résultats présentés, les questions des microbiologistes se sont faites plus précises et plus complexes : que pouvons-nous faire dans le domaine de la contamination de cultures de microorganismes par d'autres (exemple de jus de fruits contaminé par des levures ou encore de culture de levure contaminée par des bactéries) ? Cela nous amène à considérer la détection de plusieurs formes différentes dans la même image: dans quelle mesure l'accumulation de gradient peut-elle encore fonctionner ? Comment pouvons-nous résoudre le problème de la segmentation initiale et de la détection de contour que nous avons utilisé dans la phase d'étude préliminaire ? Le calcul de la courbure précise (Coeurjolly 2002) vs (Savitzky et Golay 1964) est-il crucial ? Quels invariants autres que la courbure pouvons-nous utiliser ? L'étude de ces questions nous trace des voies de travail nombreuses et excitantes.

À propos de la place du traitement des images au sein d'un laboratoire de microbiologie.

Au sein du Laboratoire PMB les besoins en imagerie et en traitement d'image semblent être grandissants. Les sujets de recherches y sont nombreux et les besoins en « extraction d'information » s'accroissent. Les questions nouvelles que les microbiologistes adressent aux traiteurs d'images

s'accumulent : sauriez-vous suivre la dynamique de l'éclatement d'une levure soumise à un laser ? Sauriez-vous le modéliser en 3D ? Que pouvez-vous faire à propos de mes images déformées par tel ou telles contraintes physiques ou optiques ? Les outils standards que manipulent les biologistes ne suffisent pas toujours. La thèse que je présente en est la parfaite illustration, mais elle n'est pas la seule. Ambroise Marin avec qui j'ai coécrit les trois articles de cette thèse travaille actuellement pour sa thèse sur une question de ce genre : sauriez-vous caractériser les granules de stress présent dans les cellules ?

Ces questions simples en apparence révèlent souvent des problématiques complexes et originales propices à la recherche. Les thèses que nous soutenons l'attestent. La recherche en traitement d'images au sein d'une équipe de microbiologistes semble profitable à de nombreux niveaux. Comment devons-nous appréhender cela à l'avenir ? Est-ce le point de départ d'une nouvelle thématique au sein du laboratoire ? Je pense (humblement) qu'il y a là des opportunités et matières à réflexion pour nos dirigeants.

VIII. Bibliographie

1. Références citées dans le manuscrit.

- Atherton, Tim J., et Darren J. Kerbyson. 1999. « Size invariant circle detection ». *Image and Vision computing* 17 (11):795-803.
- Atiquzzaman, Mohammed, et Mohammed W. Akhtar. 1995. « A robust Hough transform technique for complete line segment description ». *Real-Time Imaging* 1 (6):419-26.
- Ballard, D. H. 1987. « Readings in computer vision: issues, problems, principles, and paradigms. chapter Generalizing the hough transform to detect arbitrary shapes ». *Morgan Kaufmann Publishers Inc., San Francisco, CA, USA* 4:714-25.
- Bargougui, Ahlem, Patrice Le Pape, et Saida Triki. 2013. « Antiplasmodial efficacy of fruit extracts and cladodes of *Opuntia ficus-indica* ». *J Nat Sci Res* 3 (6):31-37.
- Beney, Laurent, Inigo Martinez de Maranon, Pierre-Andre Marechal, et Patrick Gervais. 2000. « Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ». *International journal of food microbiology* 55 (1):275-79.
- Birkhoff, Garrett. 1940. *Lattice theory*. Vol. 25. American Mathematical Soc.
- Bresenham, Jack E. 1965. « Algorithm for computer control of a digital plotter ». *IBM Systems journal* 4 (1):25-30.
- Cai, Zhongli, Niladri Chattopadhyay, Wenchao Jessica Liu, Conrad Chan, Jean-Philippe Pignol, et Raymond M. Reilly. 2011. « Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: comparison with manual counting ». *International journal of radiation biology* 87 (11):1135-46.
- Calabi, Lorenzo, et William E. Hartnett. 1968. « Shape recognition, prairie fires, convex deficiencies and skeletons ». *The American Mathematical Monthly* 75 (4):335-42.
- Campbell, Joseph. 1949. *The Hero with a Thousand Faces*.
- Canny, John. 1986. « A computational approach to edge detection ». *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, n° 6:679-98.
- Chen, Yu-Wei, et Pei-Ju Chiang. 2011. « Automatic cell counting for hemocytometers through image processing ». *World Acad Sci Eng Technol* 5.
- Cicconet, Marcelo, Davi Geiger, et Michael Werman. 2015. « Complex-valued hough transforms for circles ». In *Image Processing (ICIP), 2015 IEEE International Conference on*, 2801-4. Québec, Canada: IEEE.
- Coeurjolly, David. 2002. « Algorithmique et géométrie discrete pour la caractérisation des courbes et des surfaces ». Université Lumière-Lyon II.
- Combaret, Nicolas, et Hugues Talbot. 2007. « Robust 3D segmentation of composite materials fibres ». In *GJF BANON, J. BARRERA, U. d. M. BRAGA-NETO et NST HIRATA, eds: International Symposium on Mathematical Morphology-International Symposium on Mathematical Morphology*, 7:25-26.
- Cooley, J.W., et J.W. Tukey. 1965. « An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series ». *Math Computation* 19:297–301.
- Crosland-Taylor, P. J. 1953. « A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube ». *Nature* 171 (4340):37-38.
- Davey, H. and Kell. 1996. « Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: The Importance of Single-Cell Analyses ». *Microbiol. Rev* 60 (4):641.
- Davies, E. R. 1985. « Radial histograms as an aid in the inspection of circular objects ». In *IEE Proceedings D (Control Theory and Applications)*, 132:158-63. IET.
- . 1988. « A modified Hough scheme for general circle location ». *Pattern Recognition Letters* 7 (1):37-43.
- De Ma, Siang, et Xing Chen. 1988. « Hough transform using slope and curvature as local properties to detect arbitrary 2D shapes ». In *Pattern Recognition, 1988., 9th International Conference on*, 511-13. IEEE.

- Denimal, E., A. Marin, S. Guyot, L. Journaux, et P. Molin. 2015. « Reliable Detection and Smart Deletion of Malassez Counting Chamber Grid in Microscopic White Light Images for Microbiological Applications ». *Microsc Microanal* 21:886–892.
- Denimal, Emmanuel, Ambroise Marin, Stéphane Guyot, Ludovic Journaux, et Paul Molin. 2017. « Automatic Biological Cell Counting Using a Modified Gradient Hough Transform ». *Microscopy and Microanalysis* 23 (1):11-21.
- Dougherty, Edward R., et Roberto A. Lotufo. 2003. *Hands-on morphological image processing*. Vol. 59. SPIE press.
- Du, Shengzhi, Chunling Tu, Barend J. van Wyk, Elisha Oketch Ochola, et Zengqiang Chen. 2012. « Measuring straight line segments using HT butterflies ». *PloS one* 7 (3):e33790.
- Duda, Richard O., et Peter E. Hart. 1972. « Use of the Hough transformation to detect lines and curves in pictures ». *Communications of the ACM* 15 (1):11-15.
- Furukawa, Yasutaka, et Yoshihisa Shinagawa. 2003. « Accurate and robust line segment extraction by analyzing distribution around peaks in Hough space ». *Computer Vision and Image Understanding* 92 (1):1-25.
- Gervais, P., P. A. Marechal, et P. Molin. 1992. « Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability ». *Biotechnology and bioengineering* 40 (11):1435-39.
- Gervais, P., P. Molin, P. A. Marechal, et C. Herail-Foussereau. 1996. « Thermodynamics of yeast cell osmoregulation: passive mechanisms ». *Journal of Biological Physics* 22 (2):73-86.
- Gervais, Patrick, et Iñigo Martinez de Marañon. 1995. « Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1235 (1):52-56.
- Gesbert, S., V. Howard, D. Jeulin, et F. Meyer. 1990. « The use of basic morphological operations for 3D biological image analysis ». *Trans. Roy. Microsc. Soc* 1:293-96.
- Gupta. 2013. « Sobel Edge Detection Algorithm ». *Int J Comp Sci Manag Res* 2 (2):1578–1583.
- Haas, A., G. Matheron, et J. Serra. 1967. « Morphologie mathématique et granulométries en place ». In *Annales des mines*, 11:7.3.
- Hermann, Simon, et Reinhard Klette. 2007. « A comparative study on 2d curvature estimators ». In *Computing: Theory and Applications, 2007. ICCTA'07. International Conference on*, 584-89. IEEE.
- Hibar, K., M. DAAMI-REMADI, F. AYED, E.L. MAHJOUB, et M. 2007. *Fusarium crown and root rot of tomato and its chemical control*. *Int J Agric Res* 2.
- Hough, Paul VC. 1962. « Method and means for recognizing complex patterns ».
- Illingworth, John, et Josef Kittler. 1987. « The adaptive Hough transform ». *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, n° 5:690-98.
- Ji, Junhong, Guodong Chen, et Lining Sun. 2011. « A novel Hough transform method for line detection by enhancing accumulator array ». *Pattern Recognition Letters* 32 (11):1503-10.
- Kassim, Ashraf A., T. Tan, et K. H. Tan. 1999. « A comparative study of efficient generalised Hough transform techniques ». *Image and vision computing* 17 (10):737-48.
- Kierkegaard, Pär. 1992. « A method for detection of circular arcs based on the Hough transform ». *Machine Vision and Applications* 5 (4):249-63.
- Kimme, Carolyn, Dana Ballard, et Jack Sklansky. 1975. « Finding circles by an array of accumulators ». *Communications of the ACM* 18 (2):120-22.
- Kovesi, P. 1999. « Phase preserving denoising of images ». *Signal* 4:1.
- Kumagai, Shohei, et Kazuhiro Hotta. 2012. « Counting and radius estimation of lipid droplet in intracellular images ». In *Systems, Man, and Cybernetics (SMC), 2012 IEEE International Conference on*, 67-71. IEEE.
- LeCun, Y., Y. Bengio, et and G. Hinton. 2015. « Deep learning ». *Nature* 521 (7553):436–444.
- Lehmussola, Antti, Pekka Ruusuvuori, et Olli Yli-Harja. 2006. « Evaluating the performance of microarray segmentation algorithms ». *Bioinformatics* 22 (23):2910-17.
- Long, L. Rodney, Sameer K. Antani, et George R. Thoma. 2005. « Image informatics at a national research center ». *Computerized Medical Imaging and Graphics* 29 (2):171-93.

- Malassez, Louis Charl. 1873. « De la numération des globules rouges du sang. I. Des méthodes de numération. II. De la richesse du sang en globules rouges dans les différentes parties de l'arbre circulatoire. Louis-Charles Malassez ».
- Marin, A., E. Denimal, S. Guyot, L. Journaux, et P. Molin. 2014. « A Robust Generic Method for Grid Detection in White Light Microscopy Malassez Blade Images in the Context of Cell Counting ». *Microsc Microanal* 21:239–248.
- Martinez de Mara on, I., P. Gervais, et P. Molin. 1997. « Determination of cells' water membrane permeability: unexpected high osmotic permeability of *Saccharomyces cerevisiae* ». *Biotechnology and bioengineering* 56:62-70.
- Meyer, Fernand. 1979. « Cytologie quantitative et morphologie mathématiques ».
- Mille, Yannick, Jean-Philippe Obert, Laurent Beney, et Patrick Gervais. 2004. « New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium ». *Biotechnology and bioengineering* 88 (1):71-76.
- Moldavan, Andrew. 1934. « Photo-electric technique for the counting of microscopical cells ». *Science* 80:188-89.
- Mukhopadhyay, Priyanka, et Bidyut B. Chaudhuri. 2015. « A survey of Hough Transform ». *Pattern Recognition* 48 (3):993-1010.
- Mullaney, P. F., M. A. Van Dilla, J. R. Coulter, et P. N. Dean. 1969. « Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination ». *Review of Scientific Instruments* 40 (8):1029-32.
- Nielsen, Lars K., Gordon K. Smyth, et Paul F. Greenfield. 1991. « Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior ». *Biotechnology progress* 7 (6):560-63.
- Norrish, R.S. 1966. « An Equation for the Activity Coefficients and Equilibrium Relative Humidities of Water in Confectionery Syrups ». *J Food Technol* 1:25–39.
- Otsu, N. 1979. « A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms ». *Automatica* 11:23–27.
- Philippe, Diakabana, Dinga Boudjoumba Stanislas, et Mvila Armand Claude. 2014. « Isolation and screening of yeast strains involved in performing of traditional production process of cassava bioethanol ». *Int J Curr Microbiol App Sci* 3:671-84.
- Portilla, Javier, Vasily Strela, Martin J. Wainwright, et Eero P. Simoncelli. 2003. « Image denoising using scale mixtures of Gaussians in the wavelet domain ». *IEEE Transactions on Image processing* 12 (11):1338-51.
- Primary Sources Adams, Douglas. 1979. « The Hitchhiker's Guide to the Galaxy ».
- Renard, Philippe. 1991. « Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects ». *Aquaculture* 92:43-57.
- Rowling, J. K. 1998. « Harry Potter à l'école des sorciers ». *Gallimard, Folio*.
- Savitzky, Abraham, et Marcel JE Golay. 1964. « Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. » *Analytical chemistry* 36 (8):1627-39.
- Soille, P. 2003. *Morphological Image Analysis*,|| Springer-Verlag. Berlin.
- Soille, Pierre. 2013. *Morphological image analysis: principles and applications*. Springer Science & Business Media.
- Thomas, Andrew DH. 1992. « Compressing the parameter space of the generalised Hough transform ». *Pattern recognition letters* 13 (2):107-12.
- Tolkien, John Ronald Reuel. 2012. *The Lord of the Rings: One Volume*. Houghton Mifflin Harcourt.
- Turing, Alan M. 1950. « Computing machinery and intelligence ». *Mind* 59 (236):433-60.
- Valero, Silvia, Jocelyn Chanussot, Jon Atli Benediktsson, Hugues Talbot, et Bjorn Waske. 2009. « Directional mathematical morphology for the detection of the road network in very high resolution remote sensing images ». In *Image Processing (ICIP), 2009 16th IEEE International Conference on*, 3725-28. IEEE.
- Valque, Hélène, Valérie Gouyer, Frédéric Gottrand, et Jean-Luc Desseyn. 2012. « MUC5B leads to aggressive behavior of breast cancer MCF7 cells ». *PLoS One* 7 (10):e46699.
- Van Dilla, Marvin A., T. T. Truiullo, Paul F. Mullaney, et J. R. Coulter. 1969. « Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement ». *Science* 163 (3872):1213-14.

- Wei, Fei Long, Hua Yang, Hai Tao Zhang, et Zhou Ping Yin. 2013. « A Local Invariant Generalized Hough Transform Method for Integrated Circuit Visual Positioning ». *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Computer, Electrical, Automation, Control and Information Engineering* 7 (12):1568-74.
- Yang, Hua, Shijiao Zheng, Jin Lu, et Zhouping Yin. 2016. « Polygon-invariant generalized Hough transform for high-speed vision-based positioning ». *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering* 13 (3):1367-84.

2. Références citées dans les articles.

- Bresenham, Jack E. 1965. « Algorithm for computer control of a digital plotter ». *IBM Systems journal* 4 (1):25-30.
- Chen, Y.W., et P.-J. Chiang. 2011. « Automatic Cell Counting for Hemocytometers through Image Processing ». *World Acad Sci Eng Technol* 5.
- Cooley, J.W., et J.W. Tukey. 1965. « An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series ». *Math Computation* 19:297–301.
- Gupta. 2013. « Sobel Edge Detection Algorithm ». *Int J Comp Sci Manag Res* 2 (2):1578–1583.
- Hibar, K., M. Daami-remadi, f. Ayed, e.l. Mahjoub, et M. 2007. *Fusarium crown and root rot of tomato and its chemical control. Int J Agric Res* 2.
- Norrish, R.S. 1966. « An Equation for the Activity Coefficients and Equilibrium Relative Humidities of Water in Confectionery Syrups ». *J Food Technol* 1:25–39.
- Otsu, N. 1979. « A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms ». *Automatica* 11:23–27.
- Serra, J. 1982. « Image Analysis and Mathematical Morphology ». In *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Vol. 1. Academic press.
- Shapiro, L., et G.C. Stockman. 2001. « Computer Vision ». In *Computer Vision*. ed: Prentice Hall.
- Atherton, Tim J., et Darren J. Kerbyson. 1999. « Size invariant circle detection ». *Image and Vision computing* 17 (11):795-803.
- Bargougui, Ahlem, Patrice Le Pape, et Saida Triki. 2013. « Antiplasmodial efficacy of fruit extracts and cladodes of *Opuntia ficus-indica* ». *J Nat Sci Res* 3 (6):31-37.
- Dagnelie P. 2011. *Statistique théorique et appliquée. Tome 2. Inférence statistique à une et à deux dimensions*. Bruxelles, De Boeck, 736 p. ISBN 978-2-8041-6336-5
- Dagnelie P. 2013. *Statistique théorique et appliquée. Tome 1. Statistique descriptive et bases de l'inférence statistique*. Bruxelles, De Boeck, 517 p. ISBN 978-2-8041-7560-3
- Kovesi, P. 1999. « Phase preserving denoising of images ». *Signal* 4:1.
- Mai, H., B. Morin, P. Pardon, P. Gonzalez, H. Budzinski, et J. Cachot. 2013. *Environmental Concentrations of Irgarol, Diuron and S-Metolachlor Induce Deleterious Effects on Gametes And*.
- Marin, A., E. Denimal, S. Guyot, L. Journaux, et P. Molin. 2014. « A Robust Generic Method for Grid Detection in White Light Microscopy Malassez Blade Images in the Context of Cell Counting ». *Microsc Microanal* 21:239–248.

- Philippe, Diakabana, Dinga Boudjoumba Stanislas, et Mvila Armand Claude. 2014. « Isolation and screening of yeast strains involved in performing of traditional production process of cassava bioethanol ». *Int J Curr Microbiol App Sci* 3:671-84.
- Renard, Philippe. 1991. « Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects ». *Aquaculture* 92:43-57.
- Valque, Hélène, Valérie Gouyer, Frédéric Gottrand, et Jean-Luc Desseyn. 2012. « MUC5B leads to aggressive behavior of breast cancer MCF7 cells ». *PLoS One* 7 (10):e46699.
- Voicu, L.I., H.R. Myler, et A.R. Weeks. 1997. « Practical Considerations on Color Image Enhancement Using Homomorphic Filtering ». *J Electron Imaging* 6:108–113.
- Williams, D.B., et V. Madisetti. 1997. « Digital Signal Processing Handbook ». In *Digital Signal Processing Handbook*. London: CRC Press, Inc.

IX. Annexes

1. Reproduction du rapport de comptage manuel de cellules du CTCB

Avec l'aimable autorisation de Stéphanie ALBAREDE.



Centre Toulousain
pour le Contrôle de qualité
en Biologie clinique

COMPTE RENDU : n°161
EEQ : Comptage manuel des cellules
dans les liquides physiologiques

Association déclarée à la Préfecture de la Haute-Garonne le 30 Octobre 1973
et enregistrée sous le n°W313002633
CTCB - 33 route de Bayonne - 31300 TOULOUSE
☎ : 05 34 51 49 80 – Fax : 01 57 67 25 90
Email : secretariat.ctcb@ctcb.com – site Internet : www.ctcb.com
Siret : 428 789 853 000 28 – APE : 8559A

Date d'édition : 13/05/2016

Statut du document : Définitif

	PROGRAMME GÉRÉ PAR LE CT CB ET MUTUALISÉ AVEC L'ASSOCIATION BIOLOGIE PROSPECTIVE.	
--	--------------------------------------------------------------------------------------	--

Expert biologiste	Coordonnateur des programmes	Vérification du contenu scientifique et autorisation du rapport d'essai d'aptitude
Dr S. ALBAREDE Pharmacien Biologiste s.albarede@ctcb.com	Dr S. ALBAREDE Pharmacien Biologiste s.albarede@ctcb.com	 Signature numérique de Stéphanie ALBAREDE Date : 2016.05.13 16:14:25 +02'00'

Documentation
<p>Le compte rendu comporte les éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une partie commune pour tous les laboratoires : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Pages explicatives : présentation du programme, évaluation du laboratoire et informations générales, ✓ Exploitation statistique, ✓ Commentaire éventuel sur les réponses des participants. - Une partie propre à chaque laboratoire « Résultats individuels » en annexe 1 : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Résultats du laboratoire ✓ Evaluation de la performance du laboratoire

Sommaire	
1. Présentation du programme d'inter-comparaison	page 2
2. Traitement statistique quantitatif	page 2
3. Détermination de la notation du laboratoire	page 2
4. Analyses des réponses et commentaires	page 3-5

1 - PRESENTATION DU PROGRAMME D'INTER COMPARAISON

Coordonnateur et Expert du programme : Stéphanie Albarède, CTCB, s.albarede@ctcb.com

➤ **Produits de contrôle utilisés :**

Les échantillons sont constitués de globules rouges et globules blancs de mammifères en suspension dans un liquide équivalent au plasma contenant des agents conservateurs.

➤ **Présentation du programme:**

Ce programme comprend deux opérations annuelles avec 3 échantillons (1mL) de niveaux différents par envoi. Ces échantillons sont conçus pour le suivi des performances des comptages de cellules en technique manuelle en utilisant un hématimètre pour valider la quantité de globules rouges et blancs dans les échantillons de liquides physiologiques du corps humain. Les échantillons sont adressés aux laboratoires par la société EUROCELL. L'envoi se fait en coffret carton inséré dans une boîte polystyrène renfermant 1 ou 2 packs réfrigérants. Le transport est assuré en **EXPRESS**.

2 - TRAITEMENT STATISTIQUE QUANTITATIF

Le traitement statistique quantitatif est réalisé selon le protocole suivant :

- Exclusion des valeurs aberrantes (erreur de saisie, inversion tubes ...) par médiane +/- 50 %,
- Détermination des paramètres « ROBUSTES » à partir des valeurs restantes : nous utilisons l'Algorithme A décrit dans la norme NF ISO 13528 (Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons inter-laboratoires) pour déterminer la moyenne robuste, l'écart type robuste et le coefficient de variation robuste.
- Critères de rendus des résultats :
 - si l'effectif est supérieur ou égal à 3 pour « toutes techniques », « par hématimètre réutilisable (verre) » ou « par hématimètre à usage unique ».

En synthèse, nous obtenons :

- N : nombre de valeurs avant troncature par la médiane +/- 50 %
- N* : nombre de valeurs après troncature par la médiane +/- 50 %
- Moy r : moyenne robuste
- ET r : écart-type robuste
- CV r : coefficient de variation robuste = $(ETr \times 100) / (Moy r)$
- Min* : la plus petite valeur après troncature
- Max* : la plus grande valeur après troncature

Les moyennes robustes « Toutes techniques » sont confortées par les valeurs cibles du fournisseur et sont ensuite utilisées comme valeurs assignées pour le présent contrôle.

3 - DETERMINATION DE LA NOTATION DU LABORATOIRE

La notation en z-score n'est pas adaptée à cette analyse (trop de facteurs de variabilité) : un nombre non négligeable de résultat est éliminé par la médiane +/- 50% puis réaffecté par l'algorithme A, ce qui aurait comme impact une notation trop sévère.

Les tableaux de notation ci-dessous ont été établis à partir de valeurs normales communément admises et de l'analyse statistique « Toutes techniques » (moyenne robuste, valeurs minimum et maximum).

• **Echantillon 1611 / 1613**

Leucocytes par µl	
<200	D
200-499	C
500-799	B
800-1500	A
1501-1800	B
1801-2100	C
>2100	D

Hématies par µl	
<400	D
400-599	C
600-899	B
900-1700	A
1701-2000	B
2001-2300	C
>2300	D

Compte rendu Comptage manuel des cellules dans les liquides physiologiques 161

Campagne 2016

EN.CRHEMCOMPT.13-05-16.01

Page 2 sur 5

- Echantillon 1612

Leucocytes par μ l	
0	D
1	B
2-10	A
11-15	B
16-19	C
20	D

Hématies par μ l	
0	A
1	C
>1	D

Le système de notation repose sur l'échelle d'évaluation suivante :

- A = Réponse attendue
- B = Réponse acceptable
- C = Réponse à analyser par le laboratoire
- D = Réponse erronée

4 - ANALYSES DES REPONSES ET COMMENTAIRES

On dénombre 218 participants pour cette première enquête de comptage de cellules en hématimètre de la campagne 2016. Les effectifs des tableaux suivants sont supérieurs à 218 car les laboratoires ont eu la possibilité de rendre les résultats obtenus pour dix opérateurs différents. Ainsi, 923 opérateurs ont pu participer à ce contrôle.

Le nombre d'utilisateurs par hématimètre réutilisable est précisé dans le tableau I. Il représente 10,8 % des réponses. La cellule de Malassez a été préférentiellement utilisée.

Le nombre d'utilisateurs par hématimètre à usage unique est précisé dans le tableau II. Ce type d'hématimètre est le plus utilisé avec une prépondérance des lames Kova.

Hématimètres réutilisables	Nombre d'utilisateurs
Autre quadrillage	1
Cellule de Malassez	98
Cellule de Lemaire	1

Tableau I. Répartition des opérateurs selon l'hématimètre réutilisable

Hématimètres à usage unique	Nombre d'utilisateurs
Lame Kova	727
Cyturine/Fast read 102 (Elvetec)	65
C-Chips DHC -F01	15
Cell vision 100 μ m FR	1
Autre	22

Tableau II. Répartition des opérateurs selon l'hématimètre à usage unique

I. Traitement statistique « Toutes techniques »

On remarque dans le tableau ci-dessous que la moyenne robuste « toutes techniques » est comparable à la valeur cible fabricant, quelle que soit la lignée cellulaire ou quel que soit le niveau de concentration.

Echantillon	Paramètre	N	N*	Moy r	ET r	CV r	Min*	Max*	Valeur fabricant
1611	Hématies	923	771	1325,84	331,86	25,03	680	2013	1270
1611	Leucocytes	923	773	1195,98	284,94	23,82	610	1800	1130
1612	Hématies	922	712	0	0	0	0	0	0
1612	Leucocytes	922	471	3,02	0,90	29,96	2	4	8
1613	Hématies	921	782	1225,51	288,64	23,55	630	1890	1270
1613	Leucocytes	921	780	1114,87	257,10	23,06	567	1690	1130

Données exprimées en Nombre de cellules par µl

II. Traitement statistique « Par hématimètre réutilisable (verre) »

Echantillon	Hématimètre	Paramètre	N	N*	Moy r	ET r	CV r	Min*	Max*
1611	Cellule de Malassez	Hématies	98	95	1173,45	140	11,93	800	1600
1611	Cellule de Malassez	Leucocytes	98	93	1051,59	114,78	10,91	700	1520
1612	Cellule de Malassez	Hématies	97	73	0	0	0	0	0
1612	Cellule de Malassez	Leucocytes	97	70	3,76	1,35	35,80	2	6
1613	Cellule de Malassez	Hématies	98	92	1124,73	157,32	13,99	600	1560
1613	Cellule de Malassez	Leucocytes	98	91	1040,70	115,59	11,11	540	1420

Données exprimées en Nombre de cellules par µl

III. Traitement statistique « Par hématimètre à usage unique »

➤ Par nom commercial d'hématimètre à usage unique

Echantillon	Hématimètre	Paramètre	N	N*	Moy r	ET r	CV r	Min*	Max*
1611	C-Chips DHC-F01	Hématies	10	9	858,73	134,53	15,67	550	1010
1611	Cyturine / Fast read 102 (Elvetec)	Hématies	65	48	907,90	262,06	28,86	540	1440
1611	Lames Kova	Hématies	726	628	1407,35	354,20	25,17	741	2180
1611	C-Chips DHC-F01	Leucocytes	10	10	834,02	73,26	8,78	680	1250
1611	Cyturine / Fast read 102 (Elvetec)	Leucocytes	65	53	801,28	231,58	28,90	460	1225
1611	Lames Kova	Leucocytes	726	637	1284,76	323,01	25,14	680	1950
1612	C-Chips DHC-F01	Hématies	15	14	0	0	0	0	0
1612	Cyturine / Fast read 102 (Elvetec)	Hématies	65	57	0	0	0	0	0
1612	Lames Kova	Hématies	721	545	0	0	0	0	0
1612	C-Chips DHC-F01	Leucocytes	15	8	2	0	0	1	3
1612	Cyturine / Fast read 102 (Elvetec)	Leucocytes	65	32	3	0,86	28,80	2	4
1612	Lames Kova	Leucocytes	721	364	3	0,91	30,26	2	4
1613	C-Chips DHC-F01	Hématies	10	10	936,52	105,53	11,27	720	1063
1613	Cyturine / Fast read 102 (Elvetec)	Hématies	65	53	1094,19	226,78	20,73	550	1500
1613	Lames Kova	Hématies	725	628	1290,21	327,60	25,39	670	1953
1613	C-Chips DHC-F01	Leucocytes	10	10	863,96	65,61	7,59	775	1050
1613	Cyturine / Fast read 102 (Elvetec)	Leucocytes	65	55	1033,26	210,19	20,34	520	1400
1613	Lames Kova	Leucocytes	725	635	1172,44	301,91	25,75	601	1800

Données exprimées en Nombre de cellules par µl

➤ Par Type d'hématimètre à usage unique

Echantillon	Hématimètre	Paramètre	N	N*	Moy r	ET r	CV r	Min*	Max*
1611	Cellule de Malassez	Hématies	10	9	1008,05	83,92	8,32	920	1300
1611	Cellule de Malassez	Leucocytes	10	10	1044,00	179,16	17,16	840	1300
1612	Cellule de Malassez	Hématies	10	9	0	0	0	0	0
1612	Cellule de Malassez	Leucocytes	10	9	3	0	0	2	4
1613	Cellule de Malassez	Hématies	10	10	1020,59	130,59	12,79	820	1160
1613	Cellule de Malassez	Leucocytes	10	10	955,40	59,94	6,27	870	1300

Données exprimées en Nombre de cellules par µl

Compte rendu Comptage manuel des cellules dans les liquides physiologiques 161

Campagne 2016

EN.CRHEMCOMPT.13-05-16.01

Page 4 sur 5

IV. Commentaires

Les laboratoires participants étant différents d'une année à l'autre, nous avons préféré reprendre les commentaires de l'opération 152, afin que tout le monde puisse prendre en compte ces commentaires pour une bonne utilisation des échantillons et une optimisation de l'interprétation de ses résultats. Cela pourra paraître malheureusement comme une redite pour ceux qui étaient déjà inscrits l'an passé.

L'échantillon 1612 ne contenait aucune hématie, or on décompte 210 réponses (22%) pour lesquelles des hématies ont été observées dont 150 réponses avec 1 hématie et 60 réponses avec de 2 à 21 hématies par μl . Parmi ces 210 réponses erronées, 25 réponses sont obtenues en cellule réutilisable (lame de verre). Pour ces derniers, trois causes peuvent être envisagées. En effet, outre une inversion d'échantillon, un mauvais nettoyage de la cellule entre deux liquides physiologiques peut être évoqué. Pour les utilisateurs de chambre à usage unique, en dehors de l'inversion d'échantillon, ces faux positifs pourraient être liés à une diffusion de l'échantillon de la chambre voisine par un excédent de dépôt du liquide ou une pipette mal positionnée lors du dépôt.

Le comptage peut donc apparaître comme une technique simple mais demande en réalité une attention particulière (agitation correcte des échantillons pour remise en suspension des cellules, temps de repos observé dans la chambre avant lecture, volume déposé, précision du point de dépôt, entretien du matériel réutilisable). Ces trois derniers facteurs d'erreurs justifient l'utilisation d'un échantillon dépourvu d'hématies.

Rappelons donc, au vu des CV observés, qu'il est fréquent d'avoir au microscope une distribution inégale des éléments (variation significative du décompte selon les champs) notamment en présence de mucus ou d'une remise en suspension inefficace. Le dépôt de l'échantillon doit se faire en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Les éléments cellulaires doivent sédimenter dans la chambre avant la lecture (5 à 10 minutes, le dispositif de lecture bien à l'horizontale) avant de réaliser le comptage : ceci est d'autant plus important avec les échantillons de contrôle que nous vous fournissons. L'examen de plusieurs champs est nécessaire pour obtenir une moyenne représentative.

Vous pouvez utiliser les données issues de cette opération de contrôle en utilisant les données de l'ensemble des opérateurs pour les deux échantillons identiques (1611 et 1613 provenant d'un même lot de fabrication) :

- En analysant, l'inexactitude par opérateur et par résultat en pourcentage de la valeur assignée selon le calcul suivant : Inexactitude en % = $[(x - v)/v] \times 100$ où x = valeur trouvée par un opérateur pour un échantillon d'EEQ et v = valeur moyenne de l'ensemble des participants à ce contrôle. Un opérateur ayant une différence importante d'inexactitude entre les deux échantillons a probablement fait une erreur de pré-analytique (erreur d'échantillon ou mauvaise préparation), un opérateur ayant deux inexactitudes élevées peut outre ces erreurs avoir un problème de lecture. Dans ce dernier cas, il est souhaitable de réaliser une comparaison interne aux opérateurs du laboratoire sur le même dépôt d'un échantillon de patient, afin d'éliminer l'étape pré-analytique.

- En déterminant l'incertitude de mesure pour ce niveau d'échantillon en considérant les 10 résultats comme des résultats obtenus à des EEQ différents et en appliquant le protocole SH GTA 14 défini en page 17.

Rédaction :
Dr S. ALBAREDE - s.albarede@ctcb.com
Pharmacien Biologiste

PS : Ces documents doivent être archivés selon la réglementation en vigueur.

Pour tout renseignement :

COORDONNATEUR et BIOLOGISTE : Stéphanie ALBAREDE - s.albarede@ctcb.com
 ADMINISTRATIF : Marie-Christine ONDERBEKE, Tél. : 05.34.51.49.80 - Fax : 01.57.67.25.90 - secretariat.ctcb@ctcb.com
 TECHNIQUE : Delphine GARIMBAY, Tél. : 05.34.51.49.81 - d.garimbay@ctcb.com
 QUALITE : Erick SANCHEZ, Tél. : 05.34.51.49.82 - e.sanchez@ctcb.com
 INFORMATIQUE : Philippe GONZALVO - p.gonzalvo@ctcb.com

Information :

Les essais d'homogénéité et de stabilité se sont avérés conformes aux modalités décrites dans la procédure de contrôle. Les documents utilisés pour réaliser ce programme d'intercomparaison (préparation des objets d'essai, détermination des valeurs indicatives et assignées, traitement statistique, ...) sont disponibles sur demande auprès du CTCB. L'interprétation de ces résultats ne doit pas se faire isolément et doit être rapprochée de ceux obtenus lors des autres opérations de contrôle effectuées dans le cadre de l'évaluation interne et de l'évaluation externe du laboratoire.

Compte rendu Comptage manuel des cellules dans les liquides physiologiques 161

Campagne 2016

EN.CRHEMCOMPT.13-05-16.01

Page 5 sur 5

2. Documentation technique d'une pompe pour système micro fluidique.

TAKASAGO ELECTRIC, INC.

Miniature Peristaltic Pump RP-Q1



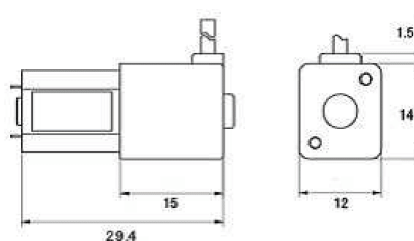
Features

- Compact size: Dimensions of 30 mm X 12 mm X 14 mm
- Low Power consumption: only 0.12 W

Specifications

Discharge Rate	0.45 ml/min $\pm 15\%$ (tap water at 20 °C)
Discharge Pressure	50 kPa
Tube Material	Silicone (I.D. 1.5 mm)
Motor	DC geared motor
Rated Voltage	DC 3 V
Power Consumption	0.12 W
Weight	11 g

Dimensions



Note: Details including specifications etc. may be changed at any time without notice.

TAKASAGO ELECTRIC, INC.

66 KAKITSUBATA, NARUMI-CHO, MIDORI-KU, NAGOYA, 458-8522 JAPAN

Tel +81-52-891-2301 Fax+81-52-891-7386

E-mail: info@takasago-elec.co.jp URL: <http://www.takasago-elec.com>

3. Plateforme de développement.



Tout ce travail de thèse et le code produit ont été développés à l'aide de MATLAB®. Si l'on se réfère à Wikipédia, Matlab® (« matrix laboratory ») est un langage de programmation de quatrième génération²¹ émulé par un environnement de développement du même nom. Il est utilisé à des fins de calcul numérique. Développé par la société The MathWorks, MATLAB permet de manipuler des matrices sans appel spéciales de fonction ni de bibliothèque, d'afficher des courbes et des données, de mettre en œuvre des algorithmes, de créer des interfaces utilisateurs, et peut s'interfacer avec d'autres langages comme le C, C++, Java, et Fortran. Les utilisateurs de MATLAB (environ un million en 2014) sont de milieux très différents comme l'ingénierie, les sciences et l'économie dans un contexte aussi bien industriel que pour la recherche. Matlab peut s'utiliser seul ou bien avec des ToolBox (« boîte à outils »).

Pour nous, l'accès à Matlab® a été rendu possible via un accès au centre de calcul scientifique de l'Université de Bourgogne (CCUB). Le CCUB dispose d'un cluster de calcul (Figure 114) formé par des machines sous le système Linux 64 bits (données de février 2016) qui rassemble 250 serveurs, 3900 cœurs, 17To RAM, une puissance de calcul de 175 Tflops et plus de 50 logiciels open source et commerciaux (académique) tel que Hyperworks, Abaqus, Comsol, ISIGHT, Cast3M, Forge, Lammmps, Gromacs, VASP, Matlab, SAS, R, Reduce, Scilab, Logiciels de génomique.



FIGURE 114 CLUSTER DE CALCUL DU CCUB

Nous disposons d'une version 2014 du programme Matlab ainsi que de nombreuses bibliothèques de fonctions appelées ToolBox. Ces ToolBox sont de véritables trésors pour celui qui souhaite développer du code dans un domaine précis tel que les réseaux de neurones ou bien comme celui qui nous

²¹ Les langages de programmation de quatrième génération sont un type de langage de programmation qui permet d'écrire plus de choses avec moins de lignes de programme et moins d'erreurs. Ils permettent de décrire certaines opérations de manière non procédurale et permettent d'obtenir rapidement des résultats à partir de courts programmes.

intéresse ici : le traitement d'image. Nous avons utilisé en particulier la ToolBox Image qui contient des centaines de fonctions de bas et haut niveau intégrant tous les outils nécessaires à la réalisation de tâches rébarbatives ou sophistiquées. Elles permettent au programmeur de se concentrer sur l'essentiel, c'est-à-dire la science et sur ses idées le libérant de basses besognes inhérentes à l'informatique de base.

L'autre avantage de Matlab est qu'il est également très bien documenté et que les fonctions qui implémentent un algorithme particulier par exemple le filtrage de Canny ou le seuillage d'Otsu font référence aux théories et aux articles scientifiques sous-jacents. De ce fait, c'est un outil précieux pour la répétabilité et pour la crédibilité du code produit et c'est une référence dans la communauté scientifique.



Je ne veux cependant pas faire une promotion excessive de cet outil qui reste cher et il est bon de savoir qu'il existe des concurrents gratuits tout aussi valables tels qu'Octave ou l'excellente bibliothèque de fonction C/C++ OpenCv d'Intel pour ne citer que ces deux-là.

Mots clefs : comptage de cellules, automatisé, robuste, cellules de Malassez, vision artificielle, détection de forme, levure, Hough, gradient, Fourier, gradient, cercle.

Résumé

Les cellules de comptage (Malassez, Thoma ...) sont conçues pour permettre le dénombrement de cellules sous microscope et la détermination de leur concentration grâce au volume calibré de la grille apparaissant dans l'image microscopique. Le comptage manuel présente des inconvénients majeurs : subjectivité, non-répétabilité... Il existe des solutions commerciales de comptage automatique dont l'inconvénient est de nécessiter un environnement bien contrôlé qu'il n'est pas possible d'obtenir dans le cadre de certaines études (ex. : le glycérol influe grandement sur la qualité des images). L'objectif du projet est donc double : un comptage des cellules automatisé et suffisamment robuste pour être réalisable, quelles que soient les conditions d'acquisition.

Dans un premier temps, une méthode basée sur la transformée de Fourier a été développée pour détecter, caractériser et effacer la grille de la cellule de comptage. Les caractéristiques de la grille extraites par cette méthode servent à déterminer une zone d'intérêt et son effacement permet de faciliter la détection des cellules à compter.

Pour réaliser le comptage, la problématique principale est d'obtenir une méthode de détection des cellules suffisamment robuste pour s'adapter aux conditions d'acquisition variables. Les méthodes basées sur les accumulations de gradients ont été améliorées par l'adjonction de structures permettant une détection plus fine des pics d'accumulation. La méthode proposée permet une détection précise des cellules et limite l'apparition de faux positifs.

Les résultats obtenus montrent que la combinaison de ces 2 méthodes permet d'obtenir un comptage répétable et représentatif d'un consensus des comptages manuels réalisés par des opérateurs.

Abstract

The counting cells (Malassez, Thoma ...) are designed to allow the enumeration of cells under a microscope and the determination of their concentration thanks to the calibrated volume of the grid appearing in the microscopic image. Manual counting has major disadvantages: subjectivity, non-repeatability ... There are commercial automatic counting solutions, the disadvantage of which is that a well-controlled environment is required which can't be obtained in certain studies (eg glycerol greatly affects the quality of the images). The objective of the project is therefore twofold: an automated cell count and sufficiently robust to be feasible regardless of the acquisition conditions.

In a first step, a method based on the Fourier transform has been developed to detect, characterize and erase the grid of the counting cell. The characteristics of the grid extracted by this method serve to determine an area of interest and its erasure makes it easier to detect the cells to count.

To perform the count, the main problem is to obtain a cell detection method robust enough to adapt to the variable acquisition conditions. The methods based on gradient accumulations have been improved by the addition of structures allowing a finer detection of accumulation peaks. The proposed method allows accurate detection of cells and limits the appearance of false positives.

The results obtained show that the combination of these two methods makes it possible to obtain a repeatable and representative count of a consensus of manual counts made by operators.
