

## CHAPITRE 2

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 2.1 Mise en contexte

Depuis le début de l'humanité, l'homme utilise les plantes autant comme nourriture que comme remède. Depuis des millénaires, les Chinois et plus près de nous, les Amérindiens, se servent des plantes à la base de leur médecine. Leur utilisation était simple; absorber les plantes directement ou par infusion. Aujourd'hui, il est commun, et même à la mode, de retrouver des extraits de plantes diverses en capsules, ampoules ou comprimés sur les tablettes de nos pharmacies. Il est connu que les plantes produisent naturellement des métabolites qui sont des molécules intéressantes, parfois uniques et difficiles à reproduire en laboratoire.

Dans le but d'augmenter la productivité et de cibler certaines molécules, les cellules de plantes sont aujourd'hui cultivées en bioréacteurs. Ce procédé est récemment devenu accessible à l'échelle industrielle. Dans le but d'identifier les espèces produisant des métabolites jusqu'alors inconnus, les recherches sont très actives dans ce domaine.

Une méthode efficace pour y parvenir est de simuler une attaque, en ajoutant de la chitine ou un produit signaléur d'agression de la plante, et de récolter la réponse chimique des cellules. Mais le moment pour simuler l'attaque est critique, la réponse chimique sera optimale lorsque les conditions de croissances sont optimales. Ce moment est relié au taux maximal de division cellulaire. Évidemment, pour connaître ce moment, il faut compter très souvent les cellules dans le bioréacteur, voir même quotidiennement. Plusieurs techniques existent pour y parvenir. Voici une revue des méthodes actuelles pour effectuer le suivi du nombre de cellules.

## 2.2 Méthodes de suivi actuelles

La méthode la plus utilisée actuellement pour recenser le nombre de cellules au sein d'un réacteur est le compte manuel à partir d'échantillons observés quotidiennement sous microscope. Par contre, le recensement manuel est ennuyeux et donne des résultats subjectifs (Fernandez, 1995). Malheureusement, l'attention et les critères de sélection d'un compteur varient en fonction du temps. De plus, chaque compteur possède ses propres critères, ce qui ajoute une marge d'erreur si plusieurs personnes assurent le suivi d'un même bioréacteur.

Ce facteur d'erreur est amplifié dans le cas de cellules de plantes. Contrairement aux levures, planctons ou cellules animales en suspension, les cellules de plantes ont tendance à se regrouper pour former des amas. Ces amas sont opaques et avec l'utilisation d'un microscope qui fait perdre la 3<sup>e</sup> dimension, il faut alors estimer le nombre de cellules manuellement.

En absence d'une méthode exacte pour connaître la concentration cellulaire quotidiennement, il existe d'autres méthodes pour estimer la biomasse au sein d'un bioréacteur pour en faire le suivi. Konstantinov (1994) et Clark (1998) présentent une revue complète qui couvre les méthodes de mesure en continu de la quantité de biomasse. Voici quelques unes des plus pertinentes.

La densimétrie à résonance acoustique est un procédé qui consiste à mesurer la masse volumique d'un liquide par résonance acoustique et à faire une corrélation empirique entre celle-ci et la concentration de biomasse. Cette technique est inapplicable pour les cellules de plantes puisqu'elle présente une faible sensibilité ( $1 \times 10^6$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ ) et une forte dépendance à la composition du milieu (le pH, la température, les bulles, etc.) De plus, les changements d'état et de morphologie des cellules influencent les résultats. Ce

procédé est utile uniquement pour des cultures homogènes contenant des cellules dont la taille demeure relativement constante durant la fermentation.

La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire consiste à faire résonner les ions  $\text{Na}^+$  ( $^{23}\text{Na}$ ) dans un échantillon, en assumant que la concentration de ces ions est plus faible et constante au sein des cellules que dans le milieu. Konstantinov (1994) indique que la méthode est insensible au changement morphologique et donne le ratio de biomasse de cellules vivantes par rapport au milieu de culture. Cette méthode est très complexe, peu sensible et dispendieuse, ce qui restreint considérablement son application pratique.

La méthode électrochimique (telle une pile à combustible) corrèle la concentration cellulaire et le courant électrique entre une anode en platine et une cathode en argent placées au sein du milieu de culture. Le courant est le résultat de l'oxydation directe des cellules sur la surface de l'anode. Bien qu'aucune description mathématique ne soit disponible, une excellente relation est observée entre le courant fourni par les électrodes et la concentration cellulaire (Sakato *et al*, 1981). En dépit de résultats positifs et par manque de bases mathématiques claires, cette méthode n'a pas trouvé d'application significative dans le suivi de culture d'autres types de cellules.

La conductivité est une autre technique qui se base sur une relation mathématique connue entre la conductivité au sein d'une suspension de cellules et la fraction de volume contenue dans ces cellules. Sur les bases d'une courbe de calibration dérivée d'une estimation théorique, les lectures ont donné une tendance consistante (Blute *et al*, 1988). En dépit d'une large marge d'erreur, cette technique permet de compter des cellules en ligne à très haute concentration et dans des conditions où d'autres techniques sont vouées à l'échec. Cependant, cette méthode sans base mathématique et théorique, n'a pas trouvé d'application pour la culture d'autres types de cellules.

La capacitance est une autre propriété électrique d'une culture de cellules basée sur le fait que chaque cellule vivante agit comme un petit condensateur. En temps réel, la capacitance d'un milieu devrait être représentative de la concentration cellulaire vivante d'un milieu. Par contre, Ils spécifient que les applications pratiques, à l'extérieur d'un cadre de recherche n'ont pas été très réussies puisque la forte influence de la résistance électrique du milieu masque sa capacitance.

Trois autres méthodes indirectes, toujours présentées par Konstantinov (1994) et Clark (1998), permettent de connaître en temps réel la concentration de biomasse : la consommation d'oxygène, la production de CO<sub>2</sub> et la production d'ATP. Ces trois techniques peuvent s'appliquer à tous types de cellule en bioréacteur, même aux cellules ancrées en amas, en autant qu'elles soient en solution.

La concentration cellulaire peut être déduite de la consommation d'oxygène (OUR), donnée qui est mesurée en temps réel. En mesurant expérimentalement la constante spécifique de consommation d'oxygène (SOUR), il est possible d'obtenir le nombre de cellules en divisant la OUR par la constante SOUR. Une relation linéaire fut établie entre l'OUR et la courbe de croissance. Par contre, la constante SOUR est valide pour de hautes concentrations cellulaires et dans des conditions où le transfert d'oxygène ne limite pas la respiration cellulaire. Adaptée, cette méthode pourrait aider à valider l'estimation de la concentration cellulaire.

La concentration cellulaire peut aussi être déduite de la production de CO<sub>2</sub>. Cette technique d'estimation de la concentration cellulaire se base sur un algorithme récursif continu lié à la lecture de la concentration de CO<sub>2</sub> dans les gaz de sortie. Cette technique est difficilement utilisable en raison du fort bruit dans le profil de l'évolution de la consommation de CO<sub>2</sub>. Cette technique pourrait être utilisée pour appuyer l'estimation basée sur la consommation d'oxygène.

L'estimation de la concentration cellulaire basée sur la production de l'ATP est plus complexe. En utilisant une constante de la production spécifique expérimentalement trouvée, d'une mesure de la production de l'ATP et de la production d'acide lactique ainsi que la consommation d'oxygène, il est possible d'estimer une concentration cellulaire. Bien que cette technique semble aussi efficace que l'estimation basée sur la consommation d'oxygène, le nombre de mesures requises en fait une méthode trop complexe pour une estimation de cette précision dans le présent contexte.

Toutes ces méthodes ne donnent qu'une vague estimation de la concentration cellulaire ou sont difficilement applicables pour des cellules de plantes. C'est pourquoi, actuellement, les cellules de plantes sont toujours dénombrées ponctuellement à la main dans des chambres de compte. Si cette méthode est valable pour l'être humain, il existe forcément une méthode automatisée comparable. Cette méthode n'a pas besoin d'être en continu, bien que ce soit l'idéal.

Une technique proposée par Wallace Coulter en 1953 est encore couramment utilisée aujourd'hui. Pour compter les cellules, celles-ci sont placées dans une solution électrolytique faible et passent dans une petite ouverture séparant deux électrodes entre lesquelles passe un courant électrique. Chaque cellule qui passe provoque un déplacement du liquide conducteur, donc une variation d'impédance électrique. Ces variations sont proportionnelles au volume de la cellule. Le nombre d'impulsions devient alors le nombre de cellules dans l'échantillon analysé, et l'amplitude, leur volume. Cette méthode fiable et précise, moyennant une calibration minutieuse, permet d'obtenir rapidement des concentrations cellulaires. Malheureusement, cette technique, qui s'applique à des suspensions homogènes de particules individuelles, ne peut être utilisée dans des cas où les cellules se regroupent pour former des amas.

Tel que défini par Ibaraki (2001), les amas ne passent pas dans la pompe de leur système en continu. Dans le cas de cellules de plantes, les amas peuvent être de dimension si

élevée, voire quelques millimètres, qu'ils empêchent l'utilisation de systèmes automatisés.

Malheureusement, bien que diversifiée, aucune technique n'est plus efficace que les comptes manuels. Compte tenu de la nature des plantes, plusieurs composés liants, dont la cellulose, lient les cellules entre elles. Cette particularité, que l'on ne rencontre pas avec les bactéries, levures et cellules animales, empêche l'utilisation de systèmes en continu et du compteur de Coulter.

### **2.3 Techniques basées sur les systèmes optiques**

Suite au survol de ces techniques, aucune ne semble parfaitement adaptée à la problématique intéressée par nos travaux. Ceci nous incite donc à explorer d'autres avenues. Ibaraki *et al.* (1994) concluent que ce sont les méthodes optiques qui sont les plus prometteuses, mais que de nombreux problèmes restent à résoudre.

Plusieurs de ces techniques sont utilisées pour recenser la concentration cellulaire en continu. Clarke *et al.* (1986) ainsi que Konstantinov *et al.* (1994) proposent de nombreuses méthodes pour mesurer la biomasse en continu. Voici un survol des techniques présentées.

Une sonde d'absorbance utilise un laser (780nm) pointé sur un récepteur qui mesure l'intensité résiduelle après que le laser ait traversé le milieu de culture. La quantité de lumière absorbée est reliée aux éléments masquant, telles les cellules. Konstantinov *et al.* (1994) proposent qu'il est possible de déterminer de façon approximative la concentration cellulaire en temps réel à l'aide d'une fonction polynomiale du troisième ordre. Par contre, cette méthode est dépendante du milieu qu'elle peut traverser, du type ainsi que de la condition des cellules. Dans le cas présent, ces facteurs varient beaucoup

et peuvent affecter significativement la mesure, contrairement au problème exposé dans la revue de Konstantinov *et al.* (1994).

Une autre approche se base sur la dispersion et utilise un laser (940nm) qui traverse la culture. Le récepteur est aligné sur la source pour mesurer les réflexions à 180 degrés. Une très bonne relation linéaire est établie entre les mesures de l'appareil et les populations de cellules *Hybridomas*, dans une concentration avoisinant  $1 \times 10^6$  et  $2 \times 10^6$  cellules par ml de concentration cellulaire. Cette méthode est soumise aux mêmes contraintes que la sonde d'absorbance au laser. De plus, ne compter que sur la biomasse ne donne aucune indication sur le nombre de cellules.

Il existe aussi des systèmes qui combinent ces deux principes. Bien que commercialisée dans les années 1980, la technologie n'a pas fait de percée depuis.

Il existe plusieurs autres méthodes basées sur les lasers. Smith *et al.* (1995) utilisent l'analyse de la taille des particules. Haselhoff (2003) utilise un système de balayages co-focaux. Les images tridimensionnelles résultantes sont excellentes mais le compte de ces images ainsi que la préparation très laborieuse des échantillons rendent cette technique inapplicable pour des comptes journaliers.

Ibaraki (2001) utilise des images macroscopiques. Des photos sont prises avec un grossissement faible de l'extérieur du flacon pour voir l'ensemble de la culture, donc l'ensemble des amas qui peuvent atteindre une taille de l'ordre de plusieurs dizaines de micromètres. Par contre, il indique que les cellules sédimentent au fond du flacon, ce qui augmente la concentration cellulaire. De plus, l'analyse d'images est plus complexe que l'évaluation individuelle des cellules. Il devient alors difficile de savoir si les photos prises sont réellement représentatives de la population. Smith (1995) se sert des images macroscopiques de suspension pour évaluer les colonies qui possèdent un taux de croissance supérieur en biomasse, qui ont moins tendance à faire des amas et qui

produisent plus de pigments. Cette technique est bonne pour obtenir des tendances de croissance générales mais pas des paramètres précis, telle la concentration cellulaire.

Ibaraki (2001) survole aussi plusieurs techniques utilisant la couleur. Peu importe la technique utilisée, soit teinte-saturation-intensité (HSI) ou rouge-vert-bleu (RGB), les cellules de plantes utilisées en suspension dans notre projet n'ont pas d'attributs couleurs utilisables. Par contre, les intensités en niveau de gris peuvent être utilisées. Olofsdotter (1993) rapporte qu'il est possible de mesurer la densité des amas de cellules à l'aide des niveaux de gris. Cette méthode semble prometteuse puisque les cellules de plantes ont une forte tendance à se regrouper. Aussi, Gram *et al.* (1996) estiment le contenu en amidon de protoplasme de pois (*Pisum sativum*) en utilisant des images vidéo prises à l'aide d'un microscope.

Suhr (1995) utilise des images microscopiques en temps réel à l'aide d'un système de vision *In situ*. La technique consiste à prendre une photo à l'aide d'un microscope dont la lentille extérieure est en contact avec le milieu. Les photos prises avec un laser pulsé donnent des images de l'intérieur du bioréacteur. Les cellules utilisées sont sphériques, de taille relativement fixe et fluorescentes. Ces paramètres servent de référence pour le reste des calculs. La fluorescence permet un bon contraste au sein du milieu. Il est possible de déduire leur profondeur par le flou des contours; plus les contours sont flous plus la cellule est loin. Pour s'assurer que les cellules ne peuvent être des deux côtés du plan focal, celui-ci se situe tout près de la lentille, à une distance moindre que le diamètre d'une cellule. Cette photo informe alors sur le nombre et la position des cellules, mais ne donne pas de volume de liquide, ce qui empêche de mesurer la concentration cellulaire. Pour ce faire, une calibration est faite avec des microsphères fluorescentes en latex prises dans un gel en silicone. Ces sphères placées à des distances connues permettent de mesurer la relation distance-flou. Le volume, qui permet de déduire la concentration, est défini par l'observation des cultures-types dont les photos sont prises au même moment que des échantillons comptés à la main dans des chambres



de compte. Cette technique ne s'applique malheureusement pas à des cellules de plantes, puisque celles-ci ne sont pas de taille et de forme fixes; paramètres essentiels à l'application de ce type de compte.

Une autre technique d'imagerie microscopique en temps réel est proposée par Bittner (1997.) Un tube contenant toutes les lentilles d'un système de vision est incorporé au sein du milieu. Pour prendre des photos, la partie inférieure de la chambre de compte remonte et enferme un certain volume de milieu dans lequel se retrouvent quelques cellules. Deux photos simultanées sont prises, dont une avec un plan focal hors champ. La chambre s'ouvre à nouveau, laissant le milieu circuler librement. Les photos prises sont analysées. La photo hors champ sert à trouver le centre des cellules en exploitant le fait qu'elles agissent comme de petites lentilles convexes et concentrent la lumière en leur centre. Grâce à cette information, les contours des cellules peuvent être facilement trouvés sur l'image normale. Le nombre et d'autres caractéristiques, telle la taille, peuvent être alors estimés. Ne sachant pas à priori le volume exact de liquide enfermé dans la chambre du microscope, la concentration est calibrée à l'aide d'échantillons comptés manuellement. La taille importante des amas, le manque d'uniformité dans la taille et la forme dans les suspensions de cellules de plantes empêchent l'utilisation de ce principe.

Toutes les techniques présentées jusqu'à présent ne sont pas directement applicables. La forme, la taille, la variance prononcée de ces paramètres dans la même culture, et surtout parce que les cellules de plantes se regroupent en amas, rendent ces techniques inapplicables. De plus, l'absorbance, la réfraction, la diffusion et tout ce qui concerne la mesure de biomasse ne sont pas des méthodes qui apportent une information précise sur le nombre de cellules. Il faut pousser plus loin le concept d'identification des cellules puisque la seule méthode qui peut apporter la concentration cellulaire passe par l'identification des cellules. Malheureusement, comme la fluorescence où les couleurs ne

sont pas des caractéristiques propres au type de cellules observées, il faudra donc en trouver d'autres.

Lors d'études précédentes qui ont mené à l'élaboration du présent projet, un programme de compte fut créé en estimant le compte cellulaire à partir de photos prises à l'aide d'un microscope à lumière directe. Cette méthode permet d'obtenir l'information la plus utile pour extraire plusieurs paramètres quantifiant une culture : la morphologie. Treskatis (1996) mentionne que la morphologie influence les propriétés d'une culture et qu'un changement morphologique indique un changement d'étape dans la croissance et la production de cellules. D'autres font les mêmes constatations. O'Shea (1996) utilise la forme pour classer des types de levures. Oh (1995) peut déterminer l'état de la germination de spores à l'aide de caractéristiques extraites de la morphologie. Par exemple, Poulsen (1995) peut déterminer si des cellules sont cancéreuses ou non par leurs formes.

Dans le cadre de ce projet, connaître l'état et la production des cellules est secondaire. La morphologie devient utile pour reconnaître et compter des cellules. Ces images doivent être prises de près puisque dans des photos macroscopiques, la morphologie n'est pas accessible. Ces images macroscopiques peuvent s'avérer un outil d'estimation, mais ne donne pas de résultats satisfaisants dans notre cas. Par exemple, Ibaraki (2001) indique que prendre des images macroscopiques pour quantifier la biomasse ou l'analyse de texture permet d'évaluer la qualité d'une suspension. Malheureusement, évaluer la quantité de cellules avec ce type d'images n'apporte pas de valeurs fiables. De plus, l'auteur indique que les résultats suggèrent que l'analyse de texture des images macroscopiques permet d'évaluer le potentiel embryogénique d'une suspension, une application intéressante mais inutile dans notre cas.

A la lueur de ces articles, une résolution suffisante pour distinguer les parois des cellules se situe à environ 100X. À partir de ce grossissement, il devient possible de voir et de compter les cellules individuellement.

Suite à cette revue, il apparaît évident que la méthode la plus précise est d'estimer la concentration cellulaire tel que les humains le font, soit en comptant directement les cellules dans une image microscopique à deux dimensions. Konstantinov (1994) conclut en disant que les méthodes optiques sont les plus prometteuses mais qu'il reste de nombreux problèmes à résoudre. Depuis, les techniques peu fiables sont délaissées et les prometteuses, tel l'imagerie, suscitent de plus en plus d'intérêt. De plus, une étude préliminaire, basée sur le traitement d'images reproduisant les méthodes humaines, présentait des résultats encourageants.

Puisque le choix se porte vers l'analyse d'images, il faut se pencher sur les problématiques qui en découlent.

## **2.4 La microscopie**

Pour utiliser le traitement d'images, il faut évidemment des images. Plusieurs techniques de microscopie sont disponibles. Afin d'expliquer le choix de la méthode qui fut retenue, voici un survol des techniques de microscopie.

### **2.4.1 La microscopie électronique**

Le principe est simple: utiliser des électrons qui possèdent une très courte longueur d'onde (0,004  $\mu\text{m}$ ) comme source d'énergie pour observer les cellules, mais la limite observable est de 2 nm, soit 10 fois mieux qu'en photonique. En raison du vide nécessaire dans le microscope ainsi que de la longue préparation pour que les électrons

interagissent avec les tissus, il est impossible d'observer des tissus vivants et hydratés, puisque les électrons interagissent principalement qu'avec les métaux.

Cette technique est utile pour voir et comprendre la structure fine d'une cellule. Par conséquent, il est impossible de compter des cellules dans un volume liquide, donc de calculer la concentration.

### **2.4.2 Les Rayons X**

Tout comme les radiographies d'hôpital, il est possible d'utiliser comme source les rayons X. Par contre, l'information reçue serait similaire à celle observée à la lumière directe, puisqu'à cette échelle les variations de densité sont similaires à l'opacité. L'utilisation de cette longueur d'onde n'est pas orthodoxe pour cette application. De plus, l'achat de matériel pour cette échelle rend cette direction impossible.

### **2.4.3 La microscopie photonique**

Soit direct ou inversé, le microscope utilise la lumière visible pour éclairer les objets observés. La microscopie photonique est limitée par l'utilisation de la lumière visible comme source d'énergie. Puisque la longueur d'onde visible la plus petite est de  $0,4 \mu\text{m}$  (le violet), le plus petit élément observé ne peut être plus petit que  $0,2 \mu\text{m}^2$ , conséquence de la nature ondulatoire de la lumière.

D'autres techniques intéressantes s'appliquent à la microscopie photonique. Voici une liste proposée dans un livre de cours intitulé *La Cellule*.

### **La coloration**

Un colorant spécifique peut être utilisé pour donner une couleur à une portion spécifique de la cellule. Éclairées à la lumière visible, les parties colorées peuvent être plus facilement observées par augmentation de contraste.

La coloration peut être très utile en microscopie photonique, mais contient ses désagréments tels le coût et la manipulation, puisque la plupart des colorants sont très nocifs pour la santé. Cette technique sera discutée lors de la présentation de la préparation.

### **La fluorescence**

Certaines cellules présentent des composantes qui deviennent fluorescentes, émettent de la lumière visible, lorsque éclairées avec une lumière ultraviolette.

Cette technique implique que des éléments des cellules soient fluorescents. Ce n'est malheureusement pas le cas. Seulement certains organes spécialisés d'espèces spécifiques le sont. Des cellules non différenciées d'une espèce ne possédant pas cette caractéristique sont utilisées.

### **L'immunofluorescence**

Dans le but d'observer des parties spécifiques d'une cellule, il est possible de créer et d'injecter des anticorps qui possèdent un marqueur fluorescent qui vont se fixer à la partie à observer. La partie devient alors fluorescente de la couleur associée au marqueur. Ce type d'imagerie donne des résultats très intéressants (voir Figure 2), malgré une préparation fastidieuse.

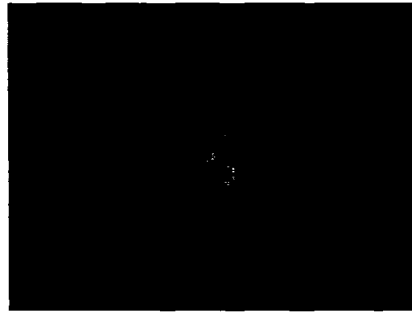


Figure 2 Exemple de photo d'immunofluorescence

Il est encore plus dispendieux d'utiliser cette technique que celle de la coloration. La préparation est aussi plus complexe. De plus, le but de cette technique est de pouvoir observer des détails au sein de la cellule, information qui n'est pas utile lorsque que l'on veut compter beaucoup de cellules.

### **Le microscope à contraste de phase ou à contraste d'interférence différentielle**

Cette technique se base sur le décalage de la lumière visible. La lumière traversant les diverses parties de la cellule subit un décalage compte tenu de leurs différents facteurs de réfraction. Ce décalage crée une augmentation ou une diminution de l'intensité lumineuse. Ceci a pour effet de créer un effet tridimensionnel à des objets qui parfois ne peuvent être observés en lumière directe. Cette approche permet aussi de voir des objets plus petits que la limite de  $0,2 \mu\text{m}$  à cause de l'effet de diffraction.

Cette technique est efficace pour de très petits objets, voire même des objets transparents, puisqu'il suffit que l'objet ait une densité différente du milieu dans lequel il est contenu. Par contre, le microscope à lumière direct peut voir les membranes par réfraction. Le surplus d'informations qu'apporte cette technique ne semble pas justifier la nécessité d'acquérir le matériel requis et de pousser plus loin l'investigation. De plus,

l'ajustement focal de ce type de microscope est assez laborieux, et ce à chaque plan de chaque image.

### **L'analyse et le traitement d'images**

Bien qu'applicable à d'autres techniques, le traitement d'images est très populaire en microscopie photonique. Après certaines manipulations, des contrastes invisibles à l'œil peuvent être mis en évidence. De plus, cette technique est la plus prometteuse pour l'étude des cellules vivantes, par exemple pour reconstituer en trois dimensions plusieurs sections minces d'une cellule numérisée, d'autant plus que le traitement d'images offre plusieurs avantages dans le cadre de ce projet. Si un ordinateur reconnaît les cellules, il peut en plus, donner de manière très détaillée, des données statistiques inaccessibles lors d'un compte manuel. De plus, ces comptes seraient constants et libèreraient les usagers pour d'autres tâches.

### **2.5 Le choix de la méthode**

Parmi les techniques disponibles, la vision semble la plus prometteuse pour le décompte des cellules végétales en suspension. Des techniques présentées, il faut éliminer celles demandant une préparation qui nécessite un traitement qui empêcherait de pouvoir calculer la concentration cellulaire. Pour calculer cette concentration, il faut compter 2 éléments, le volume et le nombre de cellules. La plupart des préparations requiert la perte de l'un ou l'autre de ces éléments.

La technique doit permettre une manipulation rapide et économique puisque l'opération de recensement cellulaire doit être effectuée quotidiennement pour chaque réacteur. Une technique qui répond à ces critères est la vision artificielle et le traitement d'images. Cette avenue permettra de compter, de mesurer et peut-être même d'apporter d'autres informations utiles. De plus, la seule technique utilisée couramment à ce jour est le

recensement manuel, technique qui utilise la vision humaine via un microscope à lumière directe.

Sur la prémisse que les humains sont capables de reconnaître et de compter des cellules, développer un outil de reconnaissance pour compter des cellules semble réalisable. Bien que cette hypothèse semble simpliste, le défi vaut la peine d'être relevé. Sur cette hypothèse, les travaux ont débuté.

## 2.6 La physiologie d'une cellule

Une compréhension complète des objets observés est nécessaire à sa reconnaissance. Pour commencer, voici un descriptif des éléments importants d'une cellule végétale (voir Figure 3,) afin de comprendre ce qui est visible (*La Cellule*).

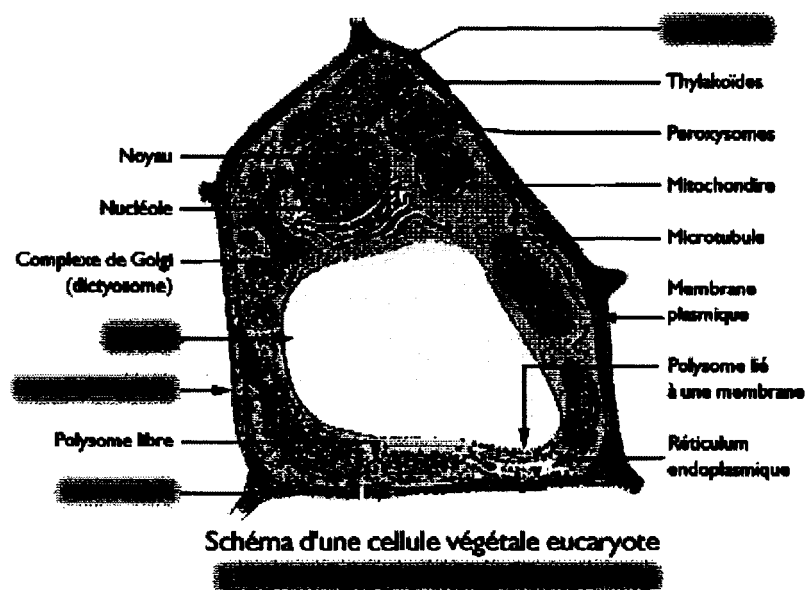


Figure 3 Description d'une cellule végétale



Une cellule végétale dans un environnement naturel est opaque et présente une couleur spécifique selon la fonction occupée au sein de la plante. Généralement, les chloroplastes donnent une teinte verte aux cellules par leur contenu en chlorophylle. Les parois internes et externes (membrane plasmique), la vacuole remplie d'eau, ainsi que la majorité des composantes internes d'une cellule sont transparentes, mais la paroi extérieure (extracellulaire) est constituée d'un complexe de protéines translucides, telles la cellulose et la pectine. Ce complexe lie les cellules entre elles et donne la rigidité nécessaire aux plantes. Cette paroi limite aussi la taille de la cellule.

Les hormones contenues dans le milieu de culture dans lequel croissent les cellules empêchent leur spécification, donc inhibe la production de chloroplastes. Par contre, la nature des cellules de plantes fait qu'elles se regroupent en liant leurs parois extracellulaires. La superposition de plusieurs cellules les rendent complètement opaques (voir Figure 9).

Pour être observables au microscope, les parois cellulaires doivent être « digérées » par des enzymes. Alors, les cellules se séparent et deviennent transparentes. Les parois et membranes de la cellule ne possèdent pas la même densité que le milieu de culture et sont, par conséquent, visibles par réfraction.

## **2.7 La segmentation**

En vision, le problème le plus important est la segmentation. Étant donné que le microscope utilisé est entièrement manuel, sauf l'iris de la caméra qui est automatique et inaccessible, les fonds sont non uniformes et variables en intensité. Autre problème à noter, la mise au point manuelle peut être faite différemment d'une image à l'autre, les parois sont alors d'intensités différentes et ne sont pas reconnues de la même manière. Finalement, une grille gravée sur le fond permet aux compteurs de calculer une concentration en indiquant un volume, mais rend la segmentation d'autant plus difficile.

Cette étape est cruciale puisque les objets d'intérêt y seront sélectionnés et rendus disponibles pour le traitement.

Lors des premiers tests, ce problème fut contourné par la création d'une *carte des lumières*. Cette carte correspond à une image prise dans les mêmes conditions, mais sans objet d'intérêt, soit les cellules, les débris et la grille dans le présent cas. Cette carte permet d'obtenir et de corriger les variations d'éclairage du microscope. Ceci est fait en appliquant deux filtres maximaux de grande dimension, suivi d'un filtre gaussien. La carte divise ensuite l'image de départ puis le résultat est normalisé entre 0 et 255. Le fond est devenu suffisamment uniforme mais les objets sont entourés de halos qui rendent la segmentation difficile. Cette technique a l'avantage de s'adapter à chaque image malgré l'effort de calcul impressionnant que l'ordinateur doit fournir, soit plus de 5 à 7 minutes sur un Pentium IV, 2 Go, pour une image couleur de 24 bits à une résolution de 640 X 480 pixels.

En finalité, cette approche fut peu robuste. Si la mise au point n'est pas identique en intensité aux images test, beaucoup de débris sont sélectionnés où les cellules deviennent si sombres qu'il devient difficile de les classer.

Vicente (1996) présente une autre méthode pour trouver la carte des lumières. Il propose de prendre chaque image en double et qu'une des deux images hors-foyer soit prise sans cellule. L'image du fond hors-foyer réduit la présence des débris et des contamineurs sur la lentille, elle peut alors s'en servir en soustrayant cette image de chaque paire d'images prises pour équilibrer l'éclairage. Chaque paire d'images est multipliée ensemble pour augmenter le contraste. Cette technique est utilisée avec des levures opaques, ce qui n'est pas le cas dans ce projet. La soustraction d'une image de fond est un concept qui est souvent utilisé (Pons, 1993, Shiotani, 1994 et Bittner *et al.*, 1998) et semble la meilleure approche pour faciliter la segmentation

Une segmentation à seuil fixe semble être la solution la plus rapide pour obtenir une sélection d'objets d'intérêt. Neelamegham (1997) met en évidence que le choix d'une constante de segmentation dépend des cellules étudiées et du degré d'illumination. Il explique aussi qu'un choix empirique apporte de bons résultats et qu'il est possible de corriger les écarts avec une série de dilatation et d'érosion, à condition que le fond soit uniforme. Une technique similaire fut utilisée précédemment et semblait donner de bons résultats, cette approche sera étudiée plus en détail.

Deux autres méthodes se sont démarquées. Heuckes (2000) propose une méthode de segmentation basée sur la perception humaine de l'intensité et de l'adaptation fovéal. Zhu (1997) propose une méthode de segmentation adaptative qualifiée d'efficace surtout pour les situations où plusieurs objets sont présents lors d'images prises avec un microscope à lumière directe. Ces deux méthodes complexes ne présentent pas d'avantages pour les présents travaux puisque les débris et variations dans la suspension seront davantage sélectionnés.

À la lueur des grandes différences de techniques entre les différents types de cellules observés, il est nécessaire de se concentrer sur une seule espèce et encore de se concentrer sur un seul état de cette même espèce. Les recherches devront être orientées selon trois volets, pour le choix de la méthode de segmentation. Premièrement, des tests avec une segmentation à seuil fixe, ensuite, la recherche concernant la «carte des lumières» qui correspond à la variation d'intensité dans le fond sans objet d'intérêt et finalement, des méthodes qui permettent le traitement de la sélection résultante.

## **2.8 La reconnaissance des objets et l'estimation du volume**

À la suite d'une segmentation, il faut traiter les objets sélectionnés. Le but est de compter le nombre de cellules dans l'échantillon. Selon la littérature, il existe beaucoup

de méthodes simples pour compter des cellules. Par contre, lorsque nous ne pouvons pas voir au sein d'un amas important, il n'existe aucune méthode applicable.

L'approche la plus intéressante est de mesurer le volume. Par exemple, Neelhamegham (1997) utilise le volume pour compter les cellules dans un amas de lymphocytes et O'shea (1996) pose l'hypothèse qu'une cellule de levure est cylindrique pour estimer la troisième dimension et en estimer le volume.

En finalité, dans les études préliminaires, la surface totale d'un amas était multipliée par un nombre estimé de cellules en hauteur. Cette hypothèse pourrait être réajustée en tenant compte de la troisième dimension, ce qui serait plus représentatif de la réalité.