

CHAPITRE 4

MÉTHODOLOGIE

4.1 Matériel utilisé

4.1.1 Les cellules

La lignée cellulaire utilisée lors de ce projet est de l'espèce *Eschscholtzia californica*, communément appelée pavot californien. Cette lignée fut démarrée et développée par le Dr Robert D. William de Avance Pharma à partir de graines. Les cellules sont sous-cultivées en pétris jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante pour démarrer une suspension cellulaire.

Les suspensions cellulaires sont maintenues sur un agitateur orbital (100 rpm) dans des flacons de 500 ml. Un volume de 240 ml de suspension est cultivé en présence de lumière à une température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Les sous-cultures sont effectuées périodiquement lorsque le volume de cellules sédimentées (SCV) se situe entre 50 et 75%. Ces suspensions servent de suspension de base pour le démarrage de bioréacteur.

4.1.2 Le milieu

Les cellules sont cultivées dans du milieu B5 (Gamborg, 1969) auquel ont été ajoutés 0.2 mg L^{-1} d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique, 0.1 mg L^{-1} de kinétine, 30 g L^{-1} de glucose et 5 mM de citrate d'ammonium. Une solution de KOH 1N permet d'ajuster le pH à 5.5 avant la stérilisation (25 minutes, 121°C , 1 bar). Ce milieu est utilisé autant en flacon qu'en bioréacteur.

4.1.3 Les bioréacteurs

Un bioréacteur de 4 L est composé d'un réservoir en verre sur lequel repose un couvercle en acier inoxydable (SS-316) usiné. Le couvercle est fixé et scellé par l'utilisation de brides et d'un joint en caoutchouc. L'agitation est effectuée par une hélice à doubles rubans hélicoïdaux et des chicanes de surface. La rotation de l'hélice est assurée par un moteur (modèle 4554-10, Stir-Pak, Cole Palmer) dont la vitesse est ajustée manuellement à 60 rpm et mesurée périodiquement à l'aide d'un tachymètre portable (modèle 20904-010, VWR).

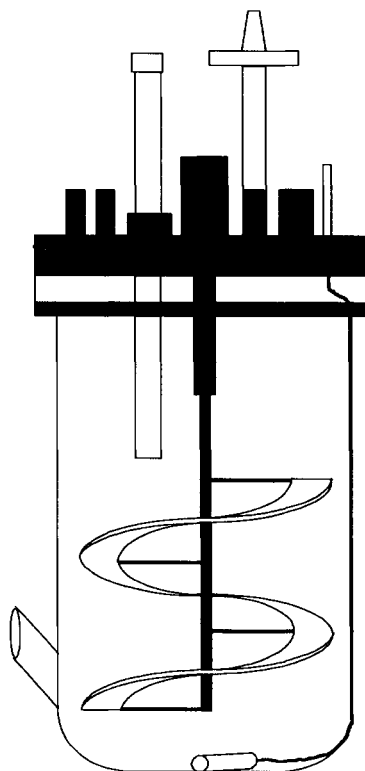


Figure 4 Bioréacteur 4L
(Galipeau, Sahra, 2004)

Ce bioréacteur, tel que schématisé à la Figure 4, possède un port d'échantillonnage à sa base et plusieurs ports sur son couvercle (voir Figure 4). Les ports du couvercle comprennent 1 port d'inoculation, 1 port d'alimentation en gaz, 1 port de sortie des gaz

et 2 ports d'alimentation en milieu ou nutriments pouvant être reliés à des réservoirs de milieu ou de nutriments spécifiques. Le couvercle contient également 1 port muni d'une sonde à oxygène dissous (modèle 322756702, Ingold, Mettler Toledo).

Les gaz d'alimentation sont stérilisés en passant par deux filtres 0.45 μm (Bacterial air vent, Gelman Sciences) consécutifs avant d'entrer par le port d'alimentation et traverser un bulleur en acier poreux à la base du bioréacteur. Le bulleur permet la création de microbulle favorisant le transfert gazeux dans le milieu de culture. Les gaz de sortie traversent une trappe à mousse avant de passer par des filtres stériles 0.45 μm (Bacterial air vent, Gelman Sciences) et sont analysés dans un moniteur à gaz carbonique (modèle 880A, Rosemount analytical).

4.1.4 Le contrôle

Les débits des entrées et des sorties de gaz sont contrôlés par des contrôleurs de débits de masse (brooks 5850E). Les ajouts liquides automatiques sont effectués par des pompes Master Flex avec une tête easy load F/L. Tous les signaux, ainsi que la lecture de la sonde à oxygène dissous et du moniteur à gaz carbonique sont lus et contrôlés par des modules Flex I/O. Ces modules automates sans processeurs sont contrôlés par un ordinateur PC embarqué ayant QNX comme système d'exploitation. Le logiciel Virgo d'Altersys construit sur mesure permet de suivre plusieurs réacteurs en même temps. Une interface Virgo Humain-Machine offre la possibilité de superviser à distance les paramètres des bioréacteurs à l'aide d'ordinateurs PC standards sous le système d'exploitation Windows 2000.

4.1.5 Le microscope

Le microscope binoculaire utilisé est de marque National DC3-163 (Figure 5). Il possède un grossissement maximal de 1000X. La lentille oculaire est de 10X et le microscope offre 4 lentilles de 4X à 100X. Une caméra d'une résolution de 640X480 permet de prendre des images de 307 200 pixels. La caméra possède un iris automatique. Une fonction permet d'équilibrer automatiquement les couleurs. Un port USB permet de visualiser et de capturer les images directement sur un ordinateur. Le déplacement de la plaque ainsi que la mise au point sont manuels.



Figure 5 Microscope National

4.1.6 L'interface

Pour accélérer les calculs de comptes automatiques, une interface (Figure 6) fut créée pour faciliter les comptes. Cette interface fut aussi créée dans le but d'être utilisée en production ou encore pour servir de modèle afin d'être programmée dans le futur pour la production.

4.1.6.1 Présentation de l'interface :

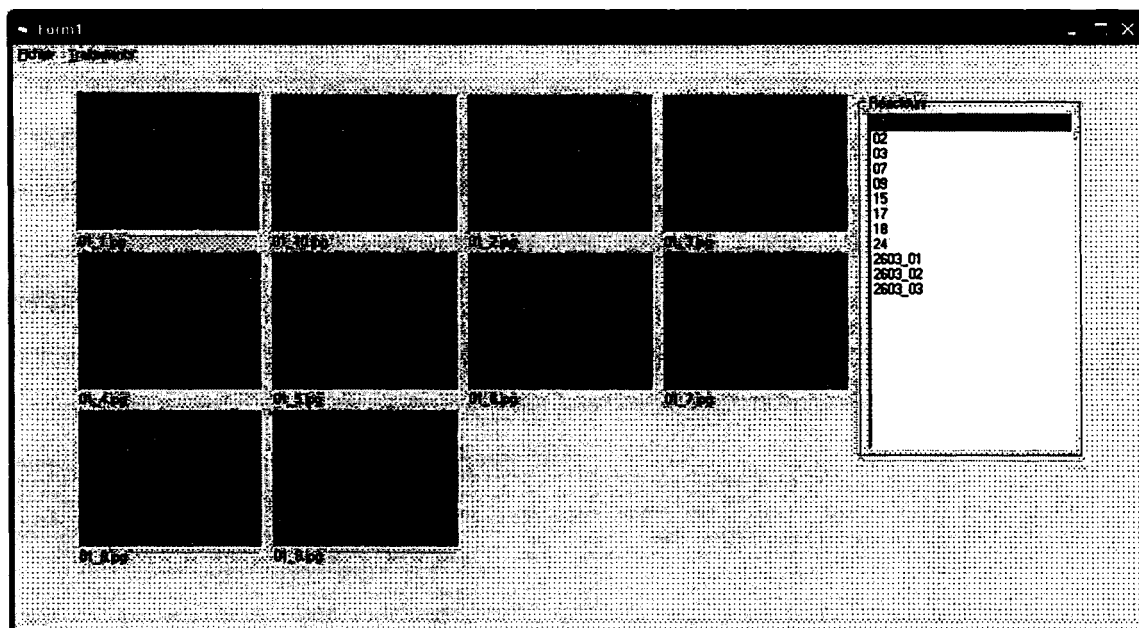


Figure 6 Présentation de l'interface

L'utilisation de cette interface permet d'éviter les tests individuels de photos et de regrouper rapidement tous les résultats. Son utilisation est telle que toutes les photos de tous les échantillons et de tous les réacteurs journaliers soient comptées automatiquement en une seule étape. Donc, un opérateur peut prendre toutes les photos et compléter l'analyse plus tard. Les données sont sauvegardées dans un format Microsoft Excel.

Sachant que le système automatique n'est pas encore robuste et ne le sera pas avant beaucoup de développements futurs, une intervention humaine est donc nécessaire. Dès la fin du calcul, l'opérateur peut vérifier plusieurs fois chacune des photos pour valider le compte. Plusieurs choix s'offrent à lui : accepter le compte, recompter la photo en entier ou retoucher l'estimation des cellules contenue dans les amas, le compte des cellules libres ou encore la taille moyenne de référence. L'opérateur peut aussi faire

apparaître une grille identique à la grille « Fush-Rosenthal », expliquée au point suivant, normalement utilisée pour le compte manuel dans le but de l'aider à compter (voir la Figure 7).

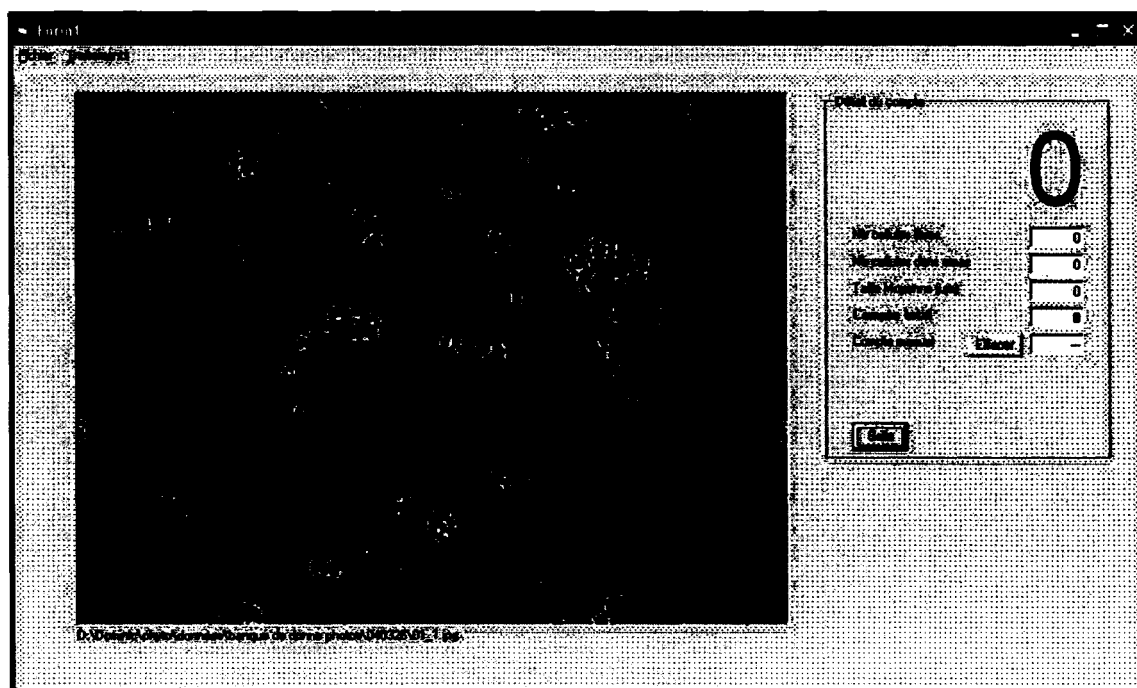


Figure 7 Interface de compte pour une image

4.1.7 La chambre de compte

Les cellules en suspension sont placées dans un hémacytomètre de la compagnie Hauser Scientific (Figure 8). Cette chambre de compte possède une grille dessinée au fond de type « Fuchs-Rosenthal » qui possède une hauteur définie de 0,2 millimètre et une grille de 0,25 mm par 0,25 mm. Il devient alors possible de connaître le volume exact de liquide dans chaque *cube* et ainsi obtenir une concentration en comptant les cellules.

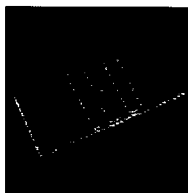


Figure 8 Hématocytomètre Fush-Rosenthal

4.1.8 Les logiciels

Le logiciel Motic Image v1.1 permet de capturer les images obtenue par la caméra. Une mise à jour fut nécessaire durant la récolte de données puisque cette version copie une tranche verticale d'une dizaine de pixels de la gauche de l'image vers la droite. Cette erreur est malheureusement présente tout au long de cette recherche. Une version supérieure, Motic Image v1.3, a permis de corriger ce problème.

Le logiciel d'analyse d'image Aphelion v3.2f est utilisé pour faire le développement. La librairie d'opérateurs a permis de tester les prototypes d'analyse d'images couramment utilisés dans les cours au moment de cette recherche.

Le programme utilisé pour le projet est construit sous Visual Basic v6.0. Cette version fut privilégiée puisque les employés d'Avance Pharma sont formés pour utiliser Visual Basic pour application (VBA) et peuvent donc comprendre et modifier le programme si nécessaire. Les librairies d'Aphelion sont compatibles et utilisables dans ce programme.

Microsoft Excel est aussi utilisé. La majorité des données sont placées dans des feuilles Excel ce qui permet facilement de pousser plus loin les analyses.

4.2 La préparation des cellules

Un échantillon de 100 ml est retiré du bioréacteur par le port d'échantillonnage. Les cellules ne sont pas utilisables telles quelles. Pour optimiser la disposition des cellules, un traitement est nécessaire sinon ce dernier est virtuellement impossible (Figure 9).



Figure 9 Exemples de cellules mal préparées

Pour améliorer la disposition des cellules, il faut les séparer en détruisant leurs parois externes. Pour ce faire, un mélange de trois enzymes est ajouté à une petite portion de suspension uniforme extraite du 100 ml retirée du bioréacteur. Le tout est agité à 250 R.P.M. pendant 60 minutes. Ensuite, 200 μ l de suspension uniforme est mélangé à 200 μ l de tampon citrate et est déposé dans la chambre de compte. Le tampon a pour but de stabiliser la taille de la cellule et d'empêcher l'éclatement osmotique. Les photos résultantes sont plus uniformes et il est maintenant possible de compter les cellules (Figure 10). Par contre, les cellules ont subi un stress très important et leur disposition peut varier énormément en fonction de la concentration cellulaire dans le bioréacteur d'origine. De plus, les amas importants restent fréquents.



Figure 10 Exemple d'une bonne disposition de cellules

En parallèle, mais à l'extérieur du cadre de ce projet, une recherche fut faite par des employés au sein de la compagnie qui supporte ce projet. Avant le début de la recherche interne, les cellules étaient préparées comme décrit ci-haut, et les résultats n'étaient pas toujours tels qu'illustrés à la Figure 10. De plus, seulement quatre photos étaient prises par le chercheur, photos prises selon ce qui lui semble le plus représentatif de la disposition des cellules, comportement qui influence la concentration résultante.

Plusieurs points ont été évalués, à savoir :

- La composition du mélange enzymatique
- La concentration du mélange enzymatique
- Le temps d'agitation
- La vitesse d'agitation
- La dilution nécessaire (répartition des cellules)
- Le nombre de photos prises

Il s'est avéré que le nombre de cellules libres était plus élevé en utilisant une concentration 6 fois plus élevée d'enzymes dans la solution. La composition des

enzymes est demeurée inchangée tout comme le temps et la vitesse d'agitation qui étaient déjà idéaux.

La dilution n'est maintenant plus fixe. Elle fut changée en fonction de la concentration cellulaire escomptée. Pour choisir le nombre de cellules à compter, un dilemme se pose. Il est évident que plus il y a de cellules comptées, plus l'erreur sur le compte imposé par la manipulation de petit volume sera réduite. Par contre, moins il y a de cellules comptées, plus le compte du compteur sera précis.

En fonction de ces informations extraite, une répartition de 50 à 100 cellules est choisie. Dans le but d'obtenir une concentration spécifique d'enzymes par cellule, on ajoute en quantité adéquate le mélange d'enzymes à concentration fixe dans l'échantillon. Ceci est possible en estimant la population en fonction des comptes précédents. Cette nouvelle technique optimise la désagrégation des amas.

La prise de quatre photos a été démontrée largement insuffisante. La même étude met en relation le nombre de photos par rapport à l'erreur. Cinq compteurs ont compté 20 images par réacteur pour trois réacteurs différents. Le compte idéal étant la moyenne des cinq compteurs pour les 20 images d'un bioréacteur. Il est apparu que l'erreur cesse de diminuer vers 10 comptes par bioréacteur. Une erreur 250% plus élevée était mesurée avec seulement quatre photos. Alors, 10 images seront utilisées pour faire les démonstrations dans ce projet.

4.3 Prise de photos

4.3.1 La prise de photos

Le chercheur ne doit pas être un facteur d'erreur dans la prise de photos. C'est pourquoi les dix photos sont prises à des endroits prédéterminés sur la plaque. Une zone sans ligne de fond couvre la moitié de la chambre de compte. Pour une photo à la fois, en partant du coin en haut à gauche, un balayage de gauche à droite et de haut en bas est fait. Auparavant, il y avait interprétation car le chercheur balayait la plaque et prenait seulement ce qui lui semblait être le plus représentatif.

La disposition des cellules à des endroits fixes peut être un problème. Si la plaque a été penchée avant d'être observée au microscope, les photos prises sur les côtés peuvent ne pas présenter de cellules. Ces cellules sont tombées dans une fosse sur les côtés et le milieu glisse par gravité vers le centre de la plaque déplaçant ainsi les cellules. Une simple vérification est faite pour prévenir ce phénomène.

Pour faciliter la reconnaissance des cellules, il faut s'assurer que les photos sont de la meilleure qualité possible. Les chercheurs font facilement la différence entre les débris, les bulles, les fibres, les racines, les courants de saccharides et les cellules, alors que cette opération peut devenir complexe pour un système de reconnaissance par vision artificielle. Ces objets sont peu fréquents et évitables, ils sont donc évités dans la séquence de prise de photos.

4.3.2 La mise au point

La mise au point est manuelle sur le microscope. Les archives ont démontré que les chercheurs tendent à faire la mise au point de façon à obtenir une image visuellement

intéressante. Cependant, ces images ne sont pas les plus faciles à traiter. Ceci est en partie causé par la faible résolution de la caméra. Une mise au point différente est nécessaire. Par expérimentation, la plus efficace est lorsque les contours des cellules sont le plus foncés, en se basant sur les cellules libres qui reposent au fond. Ceci diminue légèrement la qualité visuelle des cellules mais facilite grandement la segmentation.

De plus, cette mise au point minimise la grille du fond, ce qui évite d'avoir à la traiter puisque plusieurs tests précédents démontrent qu'à cette résolution, il est impossible de bien segmenter en excluant la grille.

4.4 Calcul de concentration

4.4.1 Le compte manuel au microscope

Le compte manuel standard s'effectue en regardant directement dans un microscope. Chaque cellule touchant à un carré (0,25 mm par 0,25mm) de la grille « Fusch-Rosenthal », microgravée au fond, est comptée en omettant les cellules qui touchent au haut et à droite des côtés de ces carrés. Les cellules qui ne font que toucher les autres côtés sont comptées comme des cellules entières. Pour ce qui est des amas, il est impossible de voir au travers, alors le nombre doit être estimé. Pour estimer un amas, le compteur regarde la taille d'une cellule libre et estime combien de fois cette cellule est incluse dans l'amas observé.

Pour obtenir une concentration, le compteur compte plusieurs carrés, en fait une moyenne et utilise le volume d'un cube (0,25mm X 0,25mm X 0,20mm) pour estimer la concentration de cellules.

Pour calculer la concentration :

Volume couvert par un carré (0,25 mm X 0,25mm X 0,20mm) = $12,5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$

Nombre de cellules moyen par carré / volume couvert par un carré = nombre de cellules par mm^3 (ou ml)

4.4.2 La technique utilisée en production

La technique utilisée en production est sensiblement la même. À l'exception près que la photo est comptée au complet. Pour calculer le volume, la résolution spatiale fut déterminée en mesurant le nombre de pixels (mesuré sur la grille) et l'espace couvert par ce carré. Après mesure, 119.2 pixels sont nécessaires pour couvrir 0.25 mm, ce qui donne $209,7 \times 10^{-6} \text{ mm} \cdot \text{pixel}^{-1}$.

Voici l'équation pour calculer la concentration.

Rappel : la magnification est de 100X

Un pixel couvre $(209,7 \times 10^{-6} \text{ pixel} \cdot \text{mm}^{-1})^2 = 4.398 \times 10^{-6} \text{ pixel} \cdot \text{mm}^{-2}$

Une photo couvre (640 pixels X 480 pixels) soit 307 200 pixels

Surface couverte par une photo = $307200 \text{ pixel} / (4.398 \times 10^{-6} \text{ pixel} \cdot \text{mm}^{-2}) = 1.351 \text{ mm}^2$

Volume couvert par une photo = $1.351 \text{ mm}^2 \times 0.20\text{mm} = 270,3 \text{ mm}^3$

Nombre de cellules moyen par photo / volume couvert par la photo = nombre de cellules par mm^2 (ou ml)

4.5 La segmentation

La segmentation est l'un des aspects les plus problématiques en vision et spécialement dans ce projet.

4.5.1 Développement de la méthode

La solution proposée est inspirée des méthodes présentées précédemment. Après observations, il s'est avéré que les fonds n'étaient pas uniformes d'une plaque à l'autre, le milieu et la plaque elle-même étant différents. L'intensité et la forme du fond varient trop pour être récupérées. Alors, selon l'hypothèse que les fonds devraient être uniformes pour toutes les photos de la même plaque, la méthode la plus simple serait la soustraction de fonds lumineux. Mais il est impossible de prendre une photo d'un fond uniforme sans utiliser de milieu, et ce milieu est variable d'un échantillon à l'autre. Alors il faut trouver une technique qui pourrait s'adapter à chaque échantillon.

Puisqu'il est impossible d'utiliser la même plaque pour prendre le fond sans les cellules, il peut tout de même être extrait au travers des dix photos prises. Puisque le fond est considéré identique d'une photo à l'autre sur la même plaque, chaque pixel inoccupé par une cellule le représenterait. Alors la technique proposée est simple, reconstituer le fond en s'assurant que l'intensité de chaque position de pixel choisi ne corresponde pas à aucun élément d'intérêt.

Pour ce faire, pour chaque position d'un pixel dans l'image, les valeurs des intensités des dix images sont classées en ordre croissant. La 7^e valeur sur 10 est choisie et insérée dans une nouvelle image. Le fond lumineux est théoriquement l'élément le plus lumineux de l'image. La 7^e valeur est choisie empiriquement pour éliminer l'effet de réfraction des cellules qui concentrent la lumière comme des lentilles ainsi que pour

éliminer une mauvaise lecture d'un capteur CCD. Après avoir parcouru toutes les positions, le fond lumineux de la plaque sans objet est obtenu dans l'image résultante. L'application d'un filtre gaussien de taille 11 X 11 élimine la faible probabilité (moins de .01%) qu'un pixel représente l'intensité d'un objet et minimise le bruit du fond lumineux résultant.

Ayant obtenu la carte des lumières, il est maintenant possible d'effectuer une simple soustraction de fond, c'est-à-dire soustraire cette carte de l'image à traiter. Ensuite, une segmentation simple de l'image est alors possible peu importe les variations du fond dans la même série.

Cette technique simple rend la segmentation beaucoup plus robuste, mais reste sensible aux problèmes de photo au sein d'une même série. Par exemple, si une image est très assombrie par un amas très important qui couvre plus de 50% de l'image (cas rare et évitable), l'iris automatique ajuste drastiquement l'intensité, ce qui rend impossible la segmentation à seuil fixe. L'opérateur doit rester vigilant pour éviter ce genre de problème.

4.5.2 Description des étapes

Voici une description plus détaillée des opérations utilisées pour effectuer une segmentation. Ces étapes ont été programmées en langage Visual Basic 6.0 de Microsoft sous l'éditeur Visual studio. Les opérateurs de traitements d'images proviennent des bibliothèques du logiciel de traitement d'image Aphelion 3.2f.

4.5.2.1 Création de la carte des lumières

Cette fonction permet d'extraire le fond lumineux, soit la carte des lumières. Cette étape est cruciale pour rendre la segmentation plus robuste. Voici les étapes.

Premièrement, dix images sont chargées en mémoire.

Fonction : `ApxImage1.read`

Ensuite, les dix images sont converties en niveaux de gris.

Fonction : `ApxImage1.Class = icGrey`

Pour chaque position de pixel dans l'image 640X480.

Les dix intensités (de toutes les images) de chacune des dix positions sont classées en ordre croissant.

Fonction : `ApxImage1.Value(Coordonnées)`

Puis, la 7^e valeur est choisie et copiée à la même position dans l'image résultante, le blanc étant la valeur maximale.

Finalement, un filtre gaussien de taille 11X11 est appliqué sur l'image résultante.

Fonction : `ApxImgFiltering1.ImgGaussianFilter ApxImage1, ApxImage1(0), 11`

Voici la carte des lumières correspondant au fond lumineux de la plaque dans une condition précise, c'est-à-dire la plaque utilisée avec l'échantillon en cours. Cette carte des lumières n'est pas réutilisable pour d'autres échantillons. Cette technique corrige par la même occasion toutes les irrégularités lumineuses causées, par exemple une lumière décentrée. La Figure 11 présente une des dix images utilisées et le résultat.

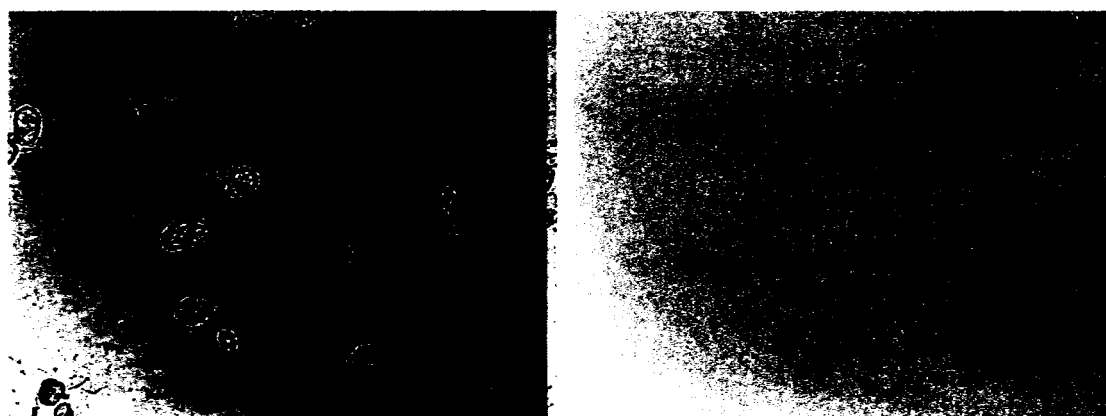


Figure 11 Une image à traiter (gauche) et la « carte des lumières » résultante (droite)

4.5.2.2 Segmentation

Suite à la création de la carte des lumières, la segmentation devient plus simple. Voici les étapes.

L'image à traiter est mise en niveau de gris.

Fonction : `ApxImage1.Class = icGrey`

Un filtre passe bas est appliqué pour réduire le bruit. Il est de petite taille (3X3) pour minimiser la perte d'informations.

Fonction : `ApxImgFiltering1.ImgLowPass3x3`

La carte des lumières est soustraite pour équilibrer l'image avant la segmentation.

Fonction : `ApxImgUtility1.ImgSubtract`

Puisque la soustraction de la carte des lumières a généré des dépassements dans les entiers non-signés, le fond n'est visuellement pas intéressant (voir Figure 12).

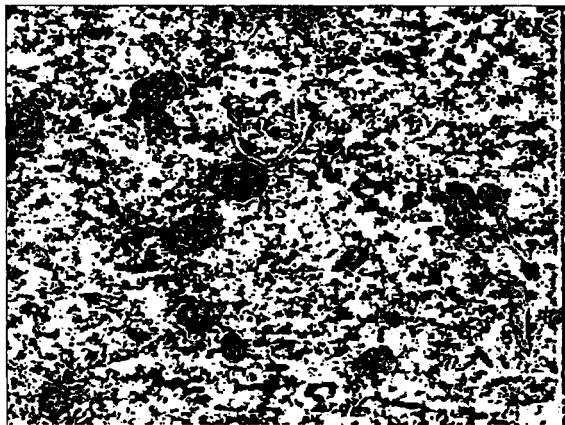


Figure 12 Résultat de la soustraction de la carte des lumières

La segmentation par tranche est utilisée pour extraire les objets d'intérêt. Les pixels d'une intensité de 50 et plus et d'une intensité de 255 et moins sont considérés comme des objets d'intérêt. Voici le résultat (Figure 13).

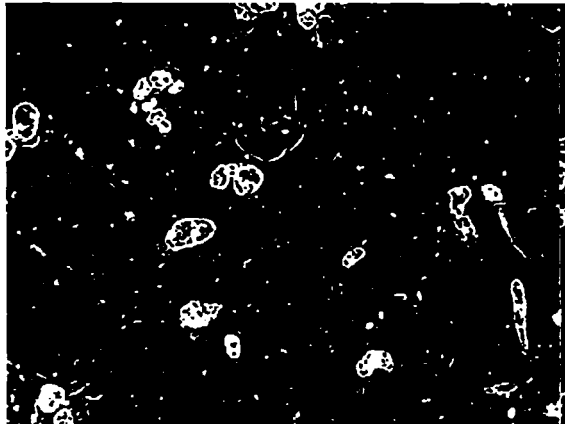


Figure 13 Résultat de la segmentation

Évidemment, beaucoup de bruit et de minuscule débris sont sélectionnés. Avant de passer à l'étape de sélection d'objets d'intérêt, l'image est nettoyée :

L'image est érodée avec l'équivalent d'un disque de taille 2, soit une croix de 3 pixels par 3 pixels. Utiliser un disque minimise la déformation des objets ronds.

Fonction : `ApxMorphology1.ImgErode`

L'image résultante de la segmentation est ensuite reconstruite avec le résultat de l'érosion. Cela a pour effet de minimiser le bruit et d'éliminer les objets trop petits pour être classés.

Cette technique de soustraction de fond est très utile pour cette application et permet de rendre robuste une simple segmentation par tranche. Voici le résultat après élimination du bruit (Figure 14).

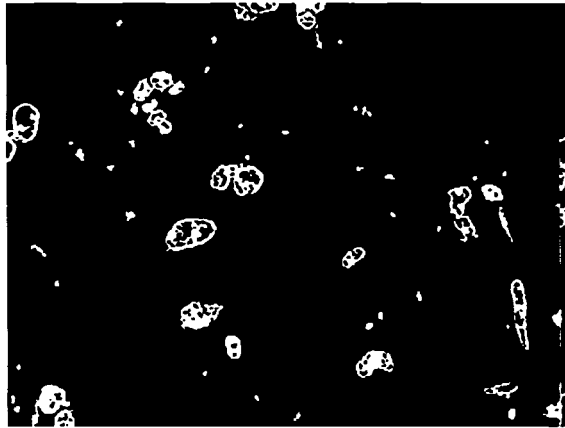


Figure 14 Image reconstruite après érosion

4.6 La sélection des objets d'intérêt

Une simple segmentation ne permettrait pas d'obtenir seulement les objets d'intérêt. L'étape suivante permet de faire une sélection plus adéquate des objets d'intérêt

4.6.1 Description des étapes

À cette étape l'image à traiter est binaire.

Un opérateur pour scinder les objets est utilisé pour séparer le plus d'objets possible.

Fonction : `ApxSegmentation1.ImgClustersSplitConvex`

Cet opérateur fait lui-même appel à d'autres opérateurs, soit « Distance » et « Watershed »

Ces opérateurs permettent de retrouver principalement des régions convexes communicantes, ce qui permet, dans certains cas, de séparer des objets cellules se touchant. Dans la Figure 15, l'amas en haut à gauche se retrouve séparé en plusieurs cellules, ce qui est plus près de la réalité.

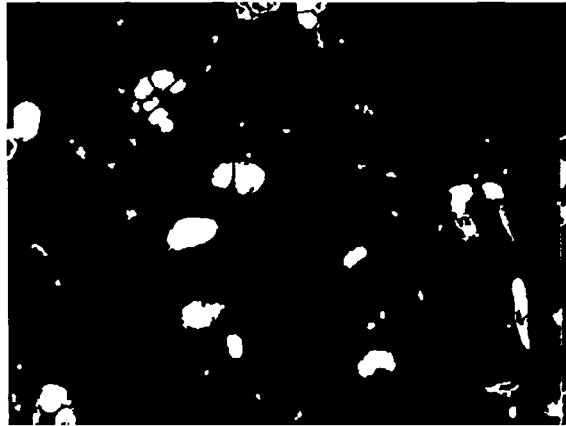


Figure 15 Résultat d'imgClusterSplitConvex

La technique de compte manuelle doit tenir compte des cellules partielles. Donc, pour obtenir un compte le plus juste possible, les cellules qui touchent le haut et la droite sont effacées de l'image et les cellules partielles restantes seront comptées comme entières. Une fonction est utilisée pour sélectionner les cellules qui touchent aux côtés de l'image.

Fonction : `ApxMorphology1.ImgBorderKill`

Pour ce faire, toutes les cellules qui possèdent un centroïde au-dessus d'une droite qui va du coin en haut à gauche au coin en bas à droite ne sont pas retenues. Un pixel dessiné sur le centroïde des cellules retenues permet à l'opérateur de reconstruction de ne garder que les cellules retenues.

Ensuite, un masque est appliqué; l'intensité de l'image originale filtrée pour le bruit est récupérée seulement sur la surface des objets retenus. Puis, une fonction est utilisée pour extraire toutes les caractéristiques nécessaires pour le classement.

Fonction : `ObjComputeMeasurements`

Le résultat final est présenté à la Figure 16.



Figure 16 Résultat après masque

4.7 Séparation des classes d'objets

Les objets doivent être comptés avec deux techniques différentes. Pour ce faire, les classes sont séparées comme suit : la taille moyenne de tous les objets est calculée, une limite, fixée par essais erreur basée sur 30 images, sépare les cellules simples et les amas. Tout objet dont la surface est supérieure au double de la moyenne est classé comme un regroupement de cellules. Cette surface limite, qui se retrouve près d'une cellule simple, peut être améliorée en ajoutant des critères de séparation entre ces deux classes. Par contre, la précision de cette limite est peu importante considérant l'influence de la méthode d'approximation des amas, car, si deux cellules se touchent et sont classées comme amas, le volume mesuré sera le volume des deux cellules. Par la suite, les caractéristiques des cellules simples sont recalculées sans les amas.

4.8 La référence

Pour confirmer les résultats, nous devons comparer les comptes au nombre réel de cellules dans la suspension. Malheureusement, il n'existe pas de méthode exacte et

accessible dans le cadre de cette recherche. La seule technique fiable reste le compte effectué par une personne expérimentée. Pour augmenter la précision, il sera possible d'effectuer la moyenne de plusieurs compteurs. Dans le cas présent ce sera la moyenne de cinq compteurs.

Il fut difficile de trouver des bonnes méthodes de reconnaissance. Compte tenu du fait que les critères de sélection varient d'un compteur à l'autre, une analyse de leurs références individuelles fut effectuée. Les meilleures techniques de sélection furent retenues. Les critères automatiques présentés précédemment ainsi que les techniques de comptes sont basés sur ces critères.

4.9 Technique de compte

Après avoir retiré tous les objets qui n'étaient pas d'intérêt, il ne reste que les cellules simples et les amas de cellules. Ces deux objets requièrent une technique de compte différente. Les cellules simples sont comptées à l'unité et les amas sont comptés comme un volume ayant pour référence les caractéristiques d'une cellule simple.

4.9.1 Les cellules simples

Après identification, les cellules simples sont comptées. Leur information est comptabilisée, soit la taille moyenne, minimum et maximum. Ces données sont comptabilisées sur toutes les images d'un échantillon de bioréacteur, ce qui augmente la précision puisque ces informations servent à estimer les comptes dans les amas.

4.9.2 Les amas

Le défi majeur de cette recherche est le compte du nombre de cellules dans un amas. Il est complexe d'obtenir une ou plusieurs vues qui permettraient de voir toutes les cellules et de les compter, car matériel devrait être développé. De plus, les cellules au centre de l'amas ne peuvent être vues en raison de l'opacité des liants entre les cellules. Il n'existe aucune méthode pour obtenir quotidiennement et dans plusieurs bioréacteurs, le nombre exact de cellules dans un amas afin de pouvoir les comparer avec des comptes automatiques de photos.

Tous les compteurs expérimentés ont leurs méthodes pour estimer les amas. La technique de base est simple. Premièrement, il faut estimer le nombre de cellules en hauteur. Ensuite, il faut estimer la surface couverte et la comparer à la surface moyenne d'une cellule simple dans l'image. La technique est simple mais souffre d'une variance énorme entre plusieurs compteurs aussi expérimentés soient-ils. (D'un facteur pouvant aller jusqu'à 10). Étant donné que la quantité de cellules incluses dans les amas est généralement supérieure au nombre de cellules libres et que l'estimation des amas par des compteurs humains est la technique la plus variable, l'automatisation de l'estimation des amas devient le point critique pour diminuer la variance dans les comptes.

La technique pour compter les amas est basée sur la technique humaine. Plusieurs paramètres ne peuvent être que vaguement estimés, soit la référence à une cellule unique, la surface de l'amas ainsi que l'épaisseur de celui-ci. Plusieurs tentatives ont été faites durant l'étude préliminaire pour trouver l'épaisseur en fonction de l'intensité, comme le font les compteurs humains. Mais avec des résultats instables, l'épaisseur maximale est fixée arbitrairement à quatre cellules, sans savoir la hauteur relative. Pour y remédier, il faut tenir compte de la hauteur de la chambre de compte.

La meilleure approche est l'estimation par volume. Pour obtenir un volume, il faut trois dimensions et pour estimer la troisième dimension, il faut poser les hypothèses suivantes. La première est que les amas sont tous ovoïdes. Puisque la croissance s'effectue dans un liquide en continu mouvement, les cellules ne sont pas soumises aux contraintes de gravité unidirectionnelle et se regroupent donc aléatoirement formant des ellipsoïdes. La deuxième est que tous les objets ovoïdes repose au fond par gravité en orientant l'axe majeur perpendiculaire au fond, tel un œuf sur une table.

Se baser uniquement sur l'opacité n'est pas adéquat puisqu'elle ne représente pas seulement le nombre de cellules, mais aussi la quantité de cellulose; une donnée inutile. Cette donnée pourrait peut-être utilisée, mais pas sans des changements majeurs à la prise de photos, tel une augmentation de résolution de la caméra et l'amélioration de l'éclairage. En utilisant le volume d'un amas, il est possible d'estimer le nombre de cellules si le volume d'une cellule unique est connu.

En estimant que la hauteur de la cellule soit égale à l'axe mineur de l'objet, l'axe majeur étant l'axe sur lequel l'objet est le plus long et l'axe mineur étant à 90 degrés de cet axe, le volume est mesuré selon la formule suivante :

$$\text{Volume d'un ellipsoïde} = \frac{4}{3} * \pi * (\text{axe majeur}/2) * (\text{axe mineur}/2)^2$$

Pour mesurer le volume d'un amas, la technique est similaire, à l'exception que la forme peut être irrégulière et ne peut être estimée comme un ovoïde. Pour ce faire, la technique la plus appropriée est la révolution des solides. L'amas est placé horizontalement sur son axe majeur. Le placer de cette façon facilite le calcul. En parcourant l'objet dans le sens de l'axe majeur, chaque hauteur en pixels, dans le sens de l'axe mineur, devient alors le diamètre d'un disque. En supposant que ce disque est d'une « épaisseur » d'un pixel, nous obtenons un volume. En additionnant tous ces disques, nous obtenons le volume total de l'amas, peu importe sa forme.

Deux ajouts se sont avérés utiles. Le premier; dans le cas d'un objet en « C », il est important de ne pas additionner les deux segments mais bien d'en faire deux petits disques. Ceci évite de surévaluer le volume d'un amas. Le deuxième; la hauteur de la chambre de compte étant connu, il est possible de limiter la hauteur de l'amas. En supposant que l'axe le plus court est naturellement perpendiculaire au fond, les disques peuvent être calculés comme des ellipses. Si le diamètre vu est plus grand que la hauteur de la chambre, l'ellipse sera calculée avec un axe de la hauteur de la chambre, soit 0.2 mm. Utiliser cette technique permet de savoir exactement combien de cellules en hauteur sont contenues dans l'amas.

Pour calculer le nombre de cellules, il faut une référence. La surface moyenne d'une cellule déjà calculée est réutilisée. Puisque la forme d'une cellule est ovoïde et tends vers la sphère, Supposons que chaque cellule est une sphère donc un rond parfait pour simplifier les calculs. Il est facile d'obtenir le diamètre en utilisant la formule de calcul de volume d'une sphère suivante:

$$\text{Volume d'une sphère} = 4/3 * \pi * (\text{diamètre}/2)^3$$

En utilisant ce diamètre, on obtient le volume moyen d'une cellule libre pour ce réacteur. En divisant le volume de l'amas par le volume d'une cellule, nous obtenons le nombre de cellules.

4.10 Construction de la base de données

Deux réacteurs furent inoculés et échantillonnés quotidiennement pendant 6 semaines. Les échantillons sont pris et les photos sont sauvegardées. Pour assurer un maximum de constance dans les comptes, chaque compteur a étiqueté toutes les photos des deux

bioréacteurs. Les résultats des comptes par vision artificielle seront comparés avec la moyenne de ces comptes.

4.11 Méthode d'estimation du nombre de cellules dans un bioréacteur

Un échantillon d'un volume fixe est prélevé du bioréacteur et mélangé avec des enzymes. Un volume est prélevé et est déposé dans le fond d'un pétri sans gel. Un volume de solution tampon est ajouté. La solution tampon est chargée en ions pour éviter l'éclatement osmotique des cellules. Tous les volumes : enzymes ajoutés, volume de l'échantillon et volume de solution tampon sont ajustés quotidiennement pour garder le nombre de cellules visibles par photo entre 50 et 100, écart mesuré à l'interne qui induit le moins d'imprécisions entre les compteurs.

4.12 Projection de la croissance

La croissance des cellules n'est pas linéaire. Elle est fonction des nutriments disponibles, de l'oxygène dissous et de nombreux autres facteurs. Même en ajoutant les nutriments absorbés en continu, le taux d'absorption change régulièrement et est difficilement prédictible. Des mesures ponctuelles permettent de savoir la concentration des nutriments. Mais le processus est long et ne peut être fait qu'une fois par jour. Durant ce délai, des changements importants d'absorption peuvent se produire. Dans le but d'être le plus précis possible, il faut que le calcul de population soit aussi représentatif que possible pour calculer le taux de croissance.

La dérivée de la population correspond au taux de croissance. Si les comptes de population dans le temps varient beaucoup, le taux de croissance devient très difficile à utiliser. Ce taux de croissance doit être le plus précis possible puisque des décisions importantes sont prises en fonction de ce taux, tel l'ajout de nutriments et la récolte.