

CHAPITRE 3

PROBLÉMATIQUE

Il est complexe de cultiver des cellules de plantes dans des bioréacteurs. La technique utilisée au sein de la compagnie pharmaceutique pose l'hypothèse que le nombre de cellules est très important dans le processus décisionnel de la culture, plus précisément le taux de croissance. Pour extraire le taux de croissance, il faut connaître l'augmentation de la concentration cellulaire, ce qui nous amène aux mesures ponctuelles les plus fréquentes possible de la concentration cellulaire dans le bioréacteur. Plus précises sont ces mesures, plus le taux de croissance, sera précis.

Le suivi est actuellement fait en prélevant un volume dans un bioréacteur en comptant les cellules dans un microscope, manuellement. Cependant, la technique engendre plusieurs problèmes. Compter une photo manuellement prend en moyenne 60 secondes. Dans les pires conditions, pour dix photos et trente-deux bioréacteurs, il faut près de cinq heures et demie de temps de compte quotidiennement. Pour minimiser le temps de compte, la tâche est partagée et les comptes sont réduits à une journée sur deux. Ce faisant, le taux de croissance n'est pas représentatif, à un point tel qu'il n'est pas utilisé dans certains cas.

En plus d'avoir des critères de sélection différents d'un compteur à l'autre, ces critères changent en fonction de l'état d'esprit du compteur ainsi que du temps passé à compter. Pour bien estimer le taux de croissance, il faut que ces comptes soient les plus constants possibles. C'est un objectif précis qui ne se mesure que par comparatif. Pour se faire le système de vision doit donc être le plus précis possible.

Le but est donc d'optimiser la constance dans les comptes pour mieux en extraire la courbe de taux de croissance.

À la lueur de cette conclusion, l'hypothèse de départ est que les comptes humains sont reproductibles de façon automatisée. Au premier abord, la solution semble difficile, mais les tests préliminaires ont démontré qu'il est possible de s'approcher des estimations humaines dans des conditions spécifiques. Le but est donc d'approcher la précision des comptes manuels et surtout d'en augmenter l'uniformité.

Voici dans l'ordre toutes les étapes qui sont reliées aux travaux.

3.1 La préparation

La préparation influence la qualité des photos. Car au début d'une culture, la concentration cellulaire est faible et les cellules sont distribuées uniformément. Plus la culture vieillit, plus les cellules se regroupent. C'est justement les amas qui rendent toutes les techniques de comptes complexes. Pour minimiser les amas, un échantillon de cellules est pris dans le bioréacteur et un mélange d'enzyme y est ajouté. Ensuite, une période d'agitation d'une heure laisse le temps aux enzymes de détruire les protéines liantes des cellules. Théoriquement les cellules sont intactes et toutes séparées. Dans les faits, lors de l'agitation les cellules seules se retrouvent agressées, peuvent mourir et ensuite éclater.

Une fois les amas séparés aux maximum, un petit volume défini est prélevé et mélangé à du tampon citrate pour stabiliser les cellules pour les photos, empêchant celles-ci d'éclater. La suspension est ensuite mise en plaque. Ces étapes préparatoires seront optimisées par les chercheurs.

3.2 La prise de photos

La prise de photos est présentement problématique. Le nombre de photos, la mise au point, le choix des endroits de prise et la préparation des cellules pour le microscope sont des points qui doivent être optimisés et uniformisés. Actuellement, chaque chercheur possède des critères de sélection qui peuvent varier pour la prise de photos, mais une procédure fixe de préparation des cellules est suivie. Cette problématique fut mentionnée à l'interne et une présentation est exposée dans la méthodologie.

3.3 La segmentation

La segmentation simple est inapplicable. Du à la mauvaise uniformité de l'éclairage les coins les plus sombre des photos peut être plus sombre que les cellules sur des parties plus claires. L'étude préliminaire démontre que la technique d'uniformisation d'éclairage est suffisante pour l'utilisation d'une segmentation simple. Par contre, des halos autour des objets rendent la sélection et le traitement de celles-ci difficiles.

3.4 Le classement

Le classement d'objets se définit par l'identification d'objets en fonction de caractéristiques. Dans le cas présent, il faut identifier des cellules biologiques, plus précisément des cellules de plantes en suspension. Deux classes s'imposent parmi les objets segmentés : les cellules et les non cellules. La classe cellules doit être séparée en deux; les cellules isolés et les amas de cellules.

En se penchant sur les caractéristiques distinctives qui permettent d'identifier les cellules, il est devenu évident que les techniques habituelles de reconnaissance de forme

ne peuvent s'appliquer, puisqu'il n'y a presque pas de caractéristiques distinctives (Bernier, 2001).

Les cellules n'ont pas de forme fixe, bien qu'elles soient généralement ovoïdales, elles peuvent présenter différentes formes allant jusqu'au tire-bouchon (3 dimensions dans le volume observé). Ensuite, ces formes n'ont aucune orientation fixe puisque les cellules évoluent et sont observées dans un volume liquide qui, de plus, possède pratiquement le même indice de réfraction que leur cytoplasme.

Les cellules n'ont pas de taille fixe. Puisque les cellules ne sont plus limitées par leurs parois externes ou leurs voisins immédiats au sein d'une plante, elles n'ont pas de taille fixe. De plus, la concentration en eau du milieu de culture influence la taille du cytoplasme cellule. Dans un cas extrême, une cellule peut être jusqu'à 500 fois supérieure en volume à celle d'une petite cellule, phénomène causée par le gonflement de sa vacuole.

Puisqu'elles ne se divisent pas à une grosseur spécifique non plus, les cellules se reproduisent plusieurs fois au long d'une culture normale. Tous les stades de croissance et de division des cellules se retrouvent donc en même temps dans l'échantillon.

Un autre phénomène qui complexifie le classement est l'occlusion. Partielles ou totales, les occlusions sont des situations très fréquentes dans les images observées. Malgré toutes les recherches sur les étapes de préparation, il est impossible d'empêcher les cellules de se regrouper lors des cultures. Aussi, le fait que les cellules soient transparentes complexifie beaucoup le traitement. Il est très difficile de manipuler des occlusions quand les cellules peuvent être ou non transparentes puisqu'on ne contrôle pas la présence de cellulose, élément liant des cellules et moins translucide que la cellule.

Les difficultés se multiplient par le fait que les éléments les plus intéressants à segmenter sont des membranes transparentes et observable que par réfraction. Donc, selon la position de la cellule dans le volume observé, une portion de la paroi peut être invisible, soit par sa position par rapport à l'observateur ou sa position par rapport au plan focal. Par exemple, si la cellule, de forme allongée, repose sur une de ses extrémités avec une inclinaison de 45 degrés, la moitié de sa membrane extérieure sera pratiquement invisible.

Finalement, puisque les amas sont partiellement opaques par la cellulose résiduelle entre les cellules, il devient impossible d'en extraire efficacement des caractéristiques fiables.

À cause du manque de références, de la difficulté à segmenter, de la complexité des objets observés, de la quantité importante de débris et de la faiblesse de la résolution de la caméra, la technique habituelle qui consiste à comparer les objets sous observation à des patrons est inapplicable.

3.5 Les caractéristiques

En observant attentivement les chercheurs effectuer le comptage, on constate que celui-ci peut s'effectuer très rapidement et qu'il semble s'accélérer avec le nombre de photos. Ceci peut impliquer deux phénomènes : le premier est que la qualité des critères de sélection diminue, le deuxième est que l'estimation des amas devient moins précise.

Cette observation laisse une marge de manœuvre au niveau de la qualité des critères d'identification des cellules libres. Si les critères d'identification des cellules libres lors des tests par vision artificielle sont plus faibles que ceux utilisés par un chercheur, ils se rapprochent après une longue période de compte. Cette hypothèse n'est pas évaluée dans ce projet.

Plusieurs algorithmes de plus haut niveau tel la transformée circulaire de Hough. L'hypothèse était que la transformée pouvait trouver des arcs de cercles, ceux-ci pourraient être utilisés. Après plusieurs semaines de travaux, cet opérateur n'a pas donné de résultats satisfaisant. La faible résolution et le manque de caractéristiques distinctives empêche l'utilisation. Cet

En raison du manque de caractéristiques distinctives, l'observation de compteurs peut nous apporter des indices sur les méthodes d'identification de cellules. Puisqu'on ne peut appliquer de patron de reconnaissance, la technique proposée est d'utiliser des algorithmes simples pour éliminer les extrêmes. Ces algorithmes ont été utilisés après observations des chercheurs qui comptent les photos. Quatre caractéristiques des objets ont été retenues : la surface, la circularité, l'élongation et l'écart type de l'intensité. Voici les explications du cheminement qui a permis d'aboutir au choix de ces caractéristiques.

3.5.1 La surface

Il est facile de poser l'hypothèse qu'une cellule possède une surface minimum et une surface maximum. En se basant sur les tailles moyennes, théoriques et observées, il est possible de fixer un seuil pour distinguer les débris d'une cellule. Dans une image, cette valeur est comptée en nombre de pixels. C'est le premier et le plus simple des critères à utiliser. Il devrait être possible de départager les cellules simples des amas de cellules par la taille des objets sélectionnés. La surface peut aussi servir à évaluer le nombre de cellules.

3.5.2 La circularité

Puisque les cellules sont en suspension, une cellule seule devrait être parfaitement sphérique, donc vue de dessus : ronde. Plus un objet est rond, moins son rapport de circularité (circonférence / aire) est élevé. Pour les objets de faible taille, la circularité peut servir à départager les cellules des autres objets. Dans certaines images, des objets non désirés sont sélectionnés, comme des taches ou courants de polysaccharides, et ces objets ont des contours très irréguliers qui les distinguent des cellules.

3.5.3 L'élongation

Les cellules peuvent être de forme allongée. Cependant, une élongation trop élevée indique que l'objet n'est pas une cellule. Tout objet linéaire, tels fibre, racine ou ligne de séparation de la plaque de comptage sélectionnée, ne sera pas retenu grâce à cette caractéristique.

3.5.4 L'écart type d'intensité

L'intérieur d'une cellule contient des organes qui peuvent être opaques ou, comme les membranes par réfraction, peuvent bloquer la lumière ou agir comme des lentilles; ce qui augmente l'intensité. Par conséquent, il y a une grande variation d'intensité au sein d'une cellule. Une variation ponctuelle dans l'éclairage, un débris ou autre objets opaques peut entraîner une diminution de l'intensité et être sélectionné par la segmentation. Donc, au delà d'un certain seuil d'écart-type d'intensité, l'objet est déclaré comme une cellule.

3.5.5 Choix des caractéristiques

Il est possible de trouver de meilleures caractéristiques et d'en utiliser un plus grand nombre. Mais le but de cette recherche est observatoire, donc si les résultats sont intéressants, l'ajout de caractéristiques ne fait qu'augmenter la précision de l'outil développé. L'utilisation des seuils caractéristiques choisis doit permettre d'éliminer les extrêmes. L'addition de plusieurs caractéristiques à seuil permissif permettra d'obtenir des résultats satisfaisants. C'est l'hypothèse posée durant l'étude préliminaire.

3.6 Les classes

L'objectif étant de reconnaître et de compter les cellules, il y aura donc deux classes. La première contient tout ce qui n'est pas une cellule, soit débris et autres. La deuxième contient toutes les cellules et amas de cellules. Les débris ne sont simplement pas retenus. Puisque dans la classe de cellules il y a aussi les amas, ceux-ci requièrent une technique de compte différente. Donc, les amas et les cellules simples seront séparés en deux classes.

3.6.1 Remarques

Dans le cadre de ce projet, l'approche système expert fut privilégiée au détriment d'un réseau de neurones. L'utilisation d'un réseau de neurones ne ferait que reproduire ce que les compteurs font, incluant leurs erreurs. En utilisant l'approche d'un système expert, il sera possible de déceler toutes les mauvaises habitudes des compteurs et peut-être même soumettre des résultats différents et justifiables.

Les caractéristiques de sélection d'origine ont été choisies après discussions et observations conjointes avec les personnes capables de compter.