

2015 - **Domaine** Outils pour la surveillance environnementale

Action 9 – FlowCAM / ZooPhytoImage



Optimisation de l'identification et du dénombrement du microphytoplancton avec le système couplé de numérisation et d'analyse d'images FlowCAM – Zoo/PhytoImage (système innovant)

Action 9 – Livrable 3. Evolution du matériel de numérisation : prototype FastCAM et perspectives

Rapport final, février 2016

Florent COLAS

Morgan TARDIVEL

Justine EVRARD

Bertrand FOREST

Marie-Pierre CRASSOUS

Michel LUNVEN

Marie-Madeleine DANIELOU

AUTEURS

Florent COLAS (Ifremer), florent.colas@ifremer.fr

Morgan TARDIVEL (Ifremer), morgan.tardivel@ifremer.fr

Justine EVRARD (Ifremer) justine.evrard@ifremer.fr

Bertrand FOREST (Ifremer) bertrand.forest@ifremer.fr

Marie-Pierre CRASSOUS (Ifremer) marie.pierre.crassous@ifremer.fr

Michel LUNVEN (Ifremer) michel.lunven@ifremer.fr

Marie-Madeleine DANIELOU (Ifremer) marie.madeleine.danielou@ifremer.fr

CORRESPONDANTS

Onema : Marie Claude XIMENES (Onema), marie-claude.ximenes@onema.fr

Ifremer : Catherine BELIN (Ifremer), catherine.belin@ifremer.fr

AUTRES CONTRIBUTEURS

Alain LEFEBVRE (Ifremer) Alain.Lefebvre@ifremer.fr

Philippe GROSJEAN (Université de Mons) Philippe.Grosjean@umons.ac.be

Catherine BELIN (Ifremer), catherine.belin@ifremer.fr

Droits d'usage : libre accès

Niveau géographique : national

Couverture géographique : nationale

Niveau de lecture : experts

RESUME

Ce livrable contient l'ensemble des travaux de développement du FastCAM, nouvel outil de numérisation rapide du phytoplancton, ayant eu lieu en 2015.

Il est constitué de deux documents :

- **un rapport de présentation du FastCAM et de sa comparaison avec le FlowCAM**

Le FlowCAM permet la numérisation d'un échantillon de phytoplancton avec des grandissements X10 et X4. Le premier permet une meilleure description morphologique et donc une meilleure résolution taxonomique mais avec un temps d'acquisition environ 16X plus long. Ainsi, pour des analyses en routine, seule une numérisation au X4 est possible. Un gain considérable serait de pouvoir réaliser une acquisition au grandissement 10X avec un temps d'analyse plus court, comparable au 4X.

Un système d'imagerie rapide en flux a donc été développé en ce sens. Il a été nommé FastCAM. Le système repose sur l'utilisation d'une caméra rapide haute résolution (2 Megapixels) permettant l'acquisition à 340 images/s. Grâce à cela, il permet de numériser 10 mL d'échantillon avec un grandissement X10 en moins de 15 min. La comparaison des images à celles obtenues avec le FlowCAM en un temps équivalent au X4 montre clairement un gain à l'utilisation du FastCAM.

Les perspectives maintenant sont la constitution d'un set d'apprentissage pour un couplage avec le logiciel Zoo/Phytoimage.

- **un diaporama de présentation du système**, présenté lors d'une réunion de projet (4 novembre 2015)

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

FlowCAM, FastCAM, imagerie rapide, phytoplancton, REPHY.

TITLE

Progression of the digitalization system: the FastCAM prototype and its outlook.

ABSTRACT

This deliverable contains all development work of the FastCAM, new tool for fast imaging of the phytoplankton, which took place in 2015.

It consists of:

- **one report of the FastCAM and its comparison with the FlowCAM presentation:**

The FlowCAM enables the digitalization of a sample of phytoplankton with X10 and X 4 magnifications. The first allows a better morphological description and therefore a higher taxonomic resolution but with a longer scan time (16 X). Thus, for routine analyses, only scanning at 4 X is possible. A considerable gain would be able to do an acquisition to the magnification 10 X with a time of analysis more short, comparable to 4 X.

A fast flow imaging system has therefore developed in this sense. He was called FastCAM. The system is based on the use of a high resolution (2 Megapixels) and high-speed camera allowing the acquisition to 340 FPS. In this way, it allows to scan 10 mL of sample with a X 10 magnification within 15 min. Comparison of the images with those obtained with the FlowCAM clearly shows a gain to the use of the FastCAM.

The outlook now is the establishment of a set of learning for a coupling with Zoo/Phytoimage and the industrial transfer of the system.

- A **slide show presentation of the system** showed during a project meeting (on the 4th of November 2015).

(THEMATIC AND GEOGRAPHIC) KEY WORDS

FlowCAM, FastCAM, fast imaging, phytoplankton, REPHY.

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERAT IONNELLE

Ce livrable contient l'ensemble des travaux de développement du FastCAM, nouvel outil de numérisation rapide du phytoplancton, ayant eu lieu en 2015.

Il est constitué de deux documents :

- **un rapport de présentation du FastCAM et de sa comparaison avec le FlowCAM :**

Le FlowCAM permet la numérisation d'un échantillon de phytoplancton avec des grossissements X10 et X4. Le premier permet une meilleure description morphologique et donc une meilleure résolution taxonomique mais avec un temps d'acquisition environ 16X plus long. Ainsi, pour des analyses en routine, seule une numérisation au X4 est possible. Un gain considérable serait de pouvoir réaliser une acquisition au grossissement 10X avec un temps d'analyse plus court, comparable au 4X.

Un système d'imagerie rapide en flux a donc été développé en ce sens. Il a été nommé FastCAM. Le système repose sur l'utilisation d'une caméra rapide haute résolution (2 Megapixels) permettant l'acquisition à 340 images/s. Comme dans le cas du FlowCAM, l'échantillon passe dans une cuve en verre de 100 µm d'épaisseur. Des flashes lumineux d'une durée de 5 µs éclairent les objets. A chaque flash, une image est enregistrée. Les images sont enregistrées sur le PC grâce à un disque rapide SSD (Solid State Disk). Une fois l'acquisition terminée, un logiciel permet de détecter les organismes sur chaque trame et de calculer cinquante et un paramètres morphométriques caractérisant la forme, la taille ou encore la teinte de l'objet. Ce sont ces données qui permettront la classification des organismes à l'aide du logiciel Zoo/Phytoimage.

Il permet de numériser 10 mL d'échantillon avec un grossissement X10 en moins de 15 min. La comparaison des images à celles obtenues avec le FlowCAM en un temps équivalent au X4 montre clairement un gain à l'utilisation du FastCAM. En effet, des vignettes issues de seize classes¹ ont été comparées. Les images du FastCAM montrent plus de détails. D'une part, le grossissement est plus grand. D'autre part, les objets sont plus transparents et les structures internes sont plus visibles. Cela est dû à une profondeur de champ plus faible dans le cas du FastCAM.

Nous pouvons donc supposer que le FastCAM couplé au logiciel Zoo/Phytoimage doit permettre une meilleure reconnaissance que le FlowCAM couplé à Zoo/Phytoimage. Les perspectives sont maintenant la constitution d'un set d'apprentissage avec Zoo/Phytoimage.

- **Un diaporama de présentation du système**, présenté lors d'une réunion de projet (4 novembre 2015) :

Le FastCAM y est présenté ainsi que la première étape de constitution d'un set d'apprentissage.

¹ *Alexandrium, Ceratium furca lineatum, Ceratium fusus, Chaetoceros, Ciliés, Cylindrotheca, Dictyocha spp, Dinophysis spp, Dissodinium, Ditylum brightwellii, Eucampia zodiacus, Guinardia delicatula, Guinardia flacida, Gymnodinium gyrodinium, Pseudo-nitzschia, Scrippsiella.*

REM
RDT

Florent Colas
Morgan Tardivel
Bertrand Forest
Justine Evrard
Marie-Pierre Crassous

Février 2016 – REM/RDT/LDCM 16-004

**FastCAM : Un nouveau système
d'imagerie numérique rapide du
phytoplancton.**

FastCAM : Un nouveau système d'imagerie numérique rapide du phytoplancton.

Table des matières

1. Introduction	6
2. Présentation du système :	6
2.1.1. Un point clef : la vitesse de numérisation :	6
2.1.2. Le système :	7
2.2. Comparaison FastCAM/FlowCAM	8
3. Conclusion :	13
4. Annexes :	14
4.1. Numérisation d'un échantillon :	14
4.1.1. Passage d'un échantillon :	14
4.1.2. Logiciel	16
4.2. Logiciel de post-traitement	18
4.2.1. La détection :	18
4.2.2. Calcul des paramètres morphométriques :	19
4.2.3. Données produites	21



1. Introduction

Le FlowCAM est un système d'imagerie en flux de particules dont la taille varie de quelques micromètres à quelques millimètres. Les clichés automatiquement enregistrés permettent une classification des particules suivant des critères morphologiques. Cette opération peut être réalisée directement par le logiciel du système ou par d'autres, tel que ZooPhytoImage, logiciel développé par l'Université de Mons, en Belgique. Le FlowCAM est développé par la société Fluid Imaging.

Le temps d'analyse d'un échantillon est un point clef de ce système. En effet, pour l'analyse du phytoplancton deux grandissements sont possibles : X10 et X4. Le premier permet une meilleure description morphologique mais avec un temps d'acquisition bien plus long que le second. Un gain considérable serait de pouvoir réaliser une acquisition au grandissement 10X avec un temps d'analyse plus court, comparable au 4X.

Un système d'imagerie rapide en flux a donc été développé en ce sens. Il sera nommé FastCAM dans la suite du rapport.

2. Présentation du système :

2.1.1. Un point clef : la vitesse de numérisation :

Le volume à numériser doit être choisi pour que la mesure soit représentative du milieu. Les analyses du REPHY reposent sur l'observation de 10 mL au microscope optique. La transposition de ce protocole au FlowCAM peut se faire en considérant que le volume à numériser doit être de 10 mL.

Le débit numérisé, défini comme le volume de solution numérisée par unité de temps, est directement donné par :

$$\Phi_{num} = NV_i \quad (1)$$

Avec N le nombre de trames acquises par la caméra par unité de temps et V_i le volume de solution correspondant à chaque trame.

Dans le cas du FlowCAM, la fréquence d'acquisition de la caméra est de 22 images/s au maximum. Pour numériser 10mL, il faut donc environ 8 et 143 min au X4 et X10 respectivement.

V_i dépend exclusivement de l'objectif choisi et de la cuve. Le FlowCAM a été optimisé en ce sens et la combinaison d'un objectif X10 avec une cuve de 100 μm d'épaisseur semble un très bon compromis. Ainsi, seule la cadence de la caméra peut être optimisée.

Il existe des caméras pouvant atteindre plusieurs milliers d'images par seconde. Toutefois, il faut alors être capable de gérer des flux de données très importants mais également éclairer l'échantillon par des impulsions très brèves, d'une durée inférieure à la μs . Le compromis que nous avons trouvé est une caméra CMOS pouvant fonctionner à une cadence de 340 images/s, avec une résolution de 2048 x 1088, soit 2 Mégapixels (contre 1,2 Mégapixels pour la caméra du FlowCAM).



2.1.2. Le système :

Le FastCAM comprend :

1. un entonnoir dans lequel est versé l'échantillon,
2. une cuve de 100 μm d'épaisseur (FC100, Fluid imaging) dans laquelle passe l'échantillon,
3. une pompe péristaltique qui aspire l'échantillon,
4. une LED rouge pilotée par un contrôleur de LED (Gardasoft, RT200) pour émettre des flashes lumineux de quelques μs ,
5. un illuminateur qui assure un éclairage homogène de la cuve reposant sur une fibre optique à grand diamètre de cœur,
6. un système de grandissement constitué d'un objectif de microscope (Olympus, X10) et d'une lentille de tube de 160 mm de focale,
7. une caméra numérique Camera-link (Ace A2000-340km, Basler),
8. une carte d'acquisition (Radien eCL, Matrox) qui permet également de synchroniser l'acquisition d'une trame avec l'émission d'un flash.
9. un ordinateur (Processeur Xeon 3Ghz, Windows 7 64bits, 16Go de ram, SSD 512 Go)
10. un logiciel d'acquisition développé en Visual basic 12,
11. un logiciel de traitement d'image développé en C# et utilisant la bibliothèque de traitement d'images Matrox MIL 10.

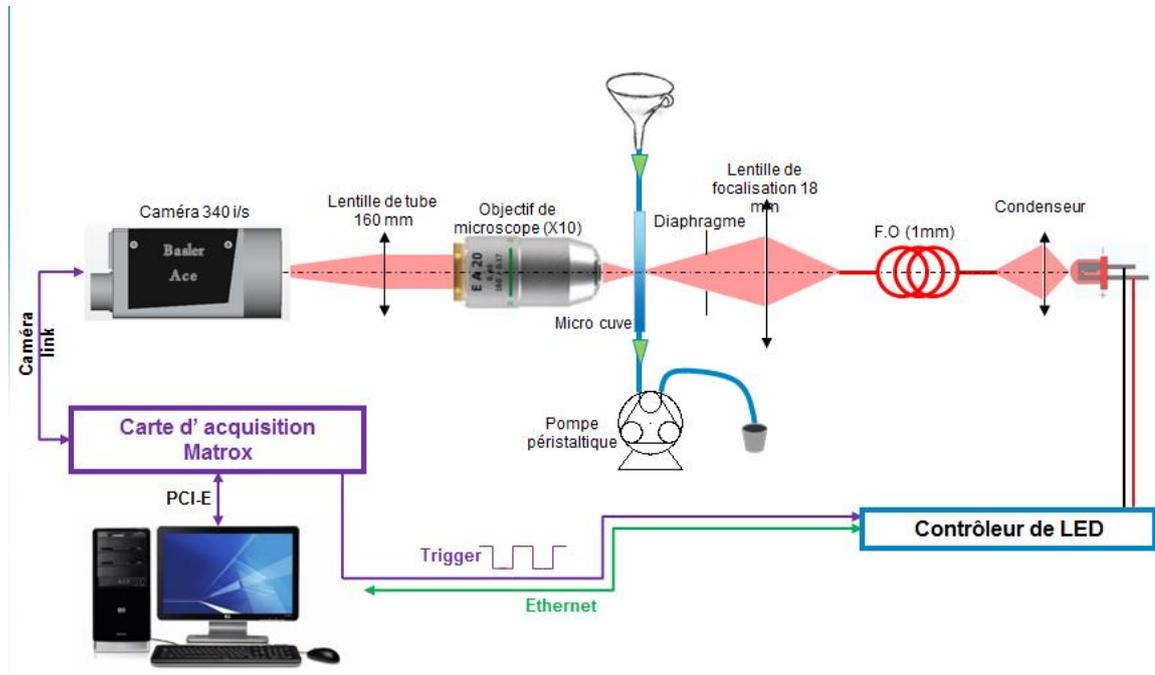


Figure 1: FastCAM

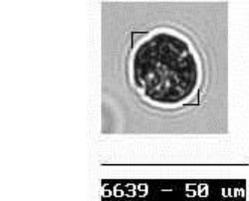
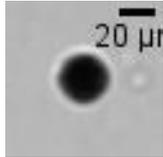
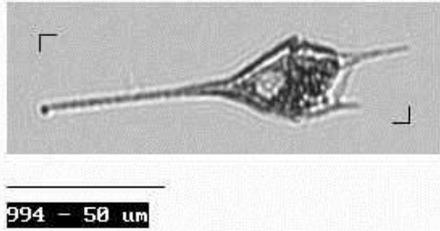
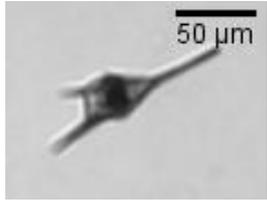
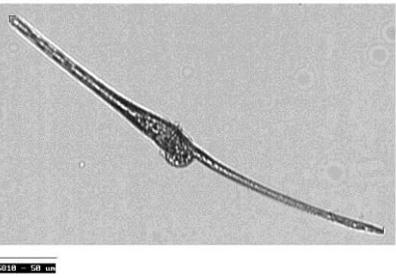
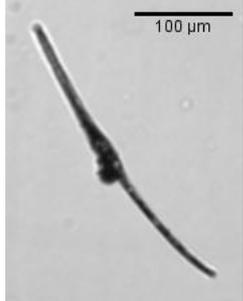
La LED pilotée par son boîtier de contrôle émet des impulsions lumineuses de 5 μs qui sont injectées dans la fibre optique à grand diamètre de cœur (1 mm) pour homogénéiser le faisceau. Celui-ci est alors focalisé en sortie de fibre sur la cuve. Un objectif de microscope associé à une lentille de tube image alors les organismes qui circulent dans la cuve sur la caméra avec un grandissement X10. Celle-ci acquiert 340 images/s grâce à la carte d'acquisition qui synchronise l'émission des flashes

lumineux avec la caméra. Les trames sont enregistrées sur le PC en temps réel grâce à un disque dur rapide (SSD, Solid State Disk).

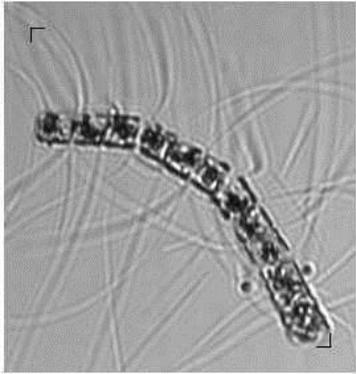
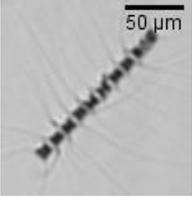
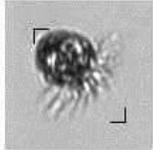
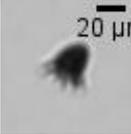
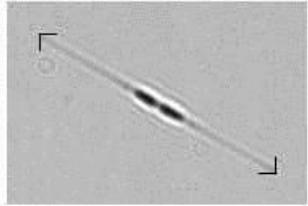
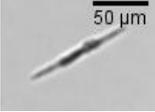
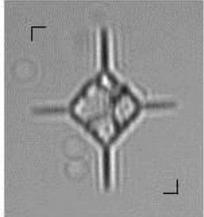
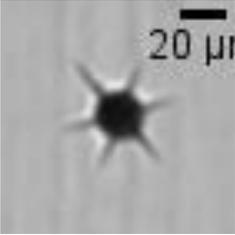
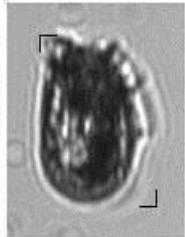
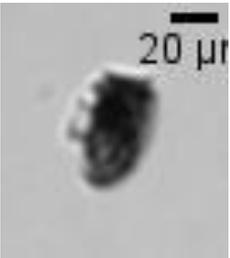
Grâce à cette architecture, le FastCAM permet de numériser un échantillon au X10 en 15 min, contre 143 min au FlowCAM. Une fois l'acquisition terminée, un logiciel de traitement permet de détecter les images des objets, de calculer les paramètres morphométriques, de générer des vignettes, des collages et de générer des fichiers contenant les paramètres utiles à la classification *via* le logiciel Zoo/PhytoImage.

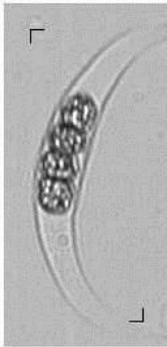
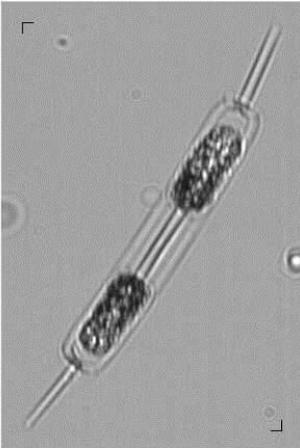
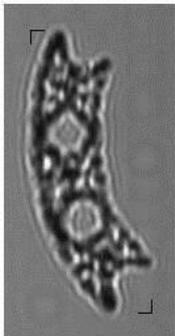
2.2. Comparaison FastCAM/FlowCAM

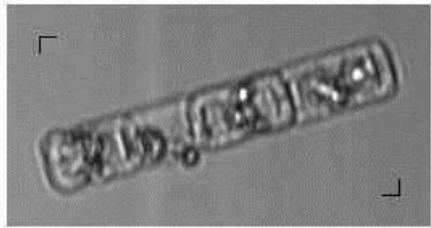
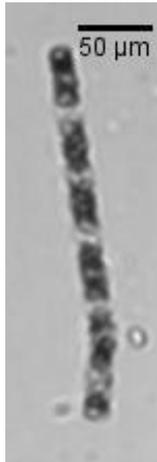
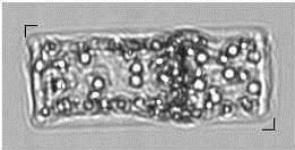
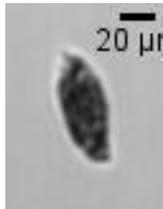
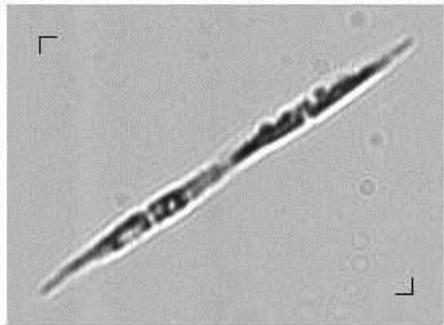
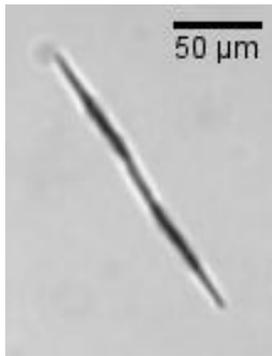
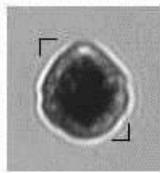
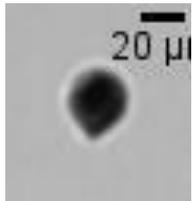
Dans le tableau suivant se trouvent des images obtenues au FastCAM et au FlowCAM pour comparaison :

Classe	FastCAM	FlowCAM
<i>Alexandrium</i>		
<i>Ceratium furca lineatum</i>		
<i>Ceratium fusus</i>		



<i>Chaetoceros</i>	 <p>517 - 50 μm</p>	 <p>50 μm</p>
<i>Ciliés</i>	 <p>3226 - 50 μm</p>	 <p>20 μm</p>
<i>Cylindrotheca</i>	 <p>1038 - 50 μm</p>	 <p>50 μm</p>
<i>Dictyocha spp</i>	 <p>4073 - 50 μm</p>	 <p>20 μm</p>
<i>Dinophysis spp</i>	 <p>4806 - 50 μm</p>	 <p>20 μm</p>

<p><i>Dissodinium</i></p>	 <p>312 - 50 μm</p>	 <p>50 μm</p>
<p><i>Ditylum brightwellii</i></p>	 <p>2381 - 50 μm</p>	 <p>50 μm</p>
<p><i>Eucampia zodiacus</i></p>	 <p>1452 - 50 μm</p>	 <p>50 μm</p>

<p><i>Guinardia delicatula</i></p>	 <p>3732 - 50 µm</p>	 <p>50 µm</p>
<p><i>Guinardia flacida</i></p>	 <p>2166 - 50 µm</p>	 <p>20 µm</p>
<p><i>Gymnodinium gyrodinium</i></p>	 <p>1473 - 50 µm</p>	 <p>20 µm</p>
<p><i>Pseudo-nitzschia</i></p>	 <p>1370 - 50 µm</p>	 <p>50 µm</p>
<p><i>Scrippsiella</i></p>	 <p>2512 - 50 µm</p>	 <p>20 µm</p>

L'examen des vignettes produites par le FlowCAM et le FastCAM montre que pour un

temps d'analyse équivalent, le FastCAM produit des images de meilleure qualité. Les organismes, sont plus transparents et les détails sont mieux visualisés. A titre d'exemple, les cellules d'*Alexandrium* sont opaques au FlowCAM et peu de détails sont visibles. Par contre, au FastCAM il est possible de voir la ceinture des cellules.



3. Conclusion :

Le FastCAM, un nouvel outil de numérisation, a été développé. Il permet de numériser 10 mL d'échantillon avec un grandissement X10 en moins de 15 min, soit 10 fois plus vite qu'avec le FlowCAM. La comparaison des images à celles obtenues avec le FlowCAM en un temps équivalent au X4 montre clairement un gain à l'utilisation du FastCAM. En effet, des vignettes issues de seize classes ont été comparées. Les images du FastCAM montrent plus de détails. D'une part, le grandissement est plus grand. D'autre part, les objets sont plus transparents et les structures internes sont plus visibles. Cela est dû à une profondeur de champ plus faible dans le cas du FastCAM.

Le FastCAM couplé à Zoo/PhytoImage doit donc permettre une meilleure reconnaissance que le FlowCAM couplé à Zoo/PhytoImage. Les perspectives sont maintenant la constitution d'un set d'apprentissage avec Zoo/PhytoImage. Son élaboration a commencé au printemps 2015 mais il doit encore être enrichi.

D'un point de vue technologique, il est maintenant nécessaire de combiner le logiciel de classification au logiciel du FastCAM pour simplifier au plus l'utilisation de l'appareil. Pour cela, Zoo/PhytoImage pourrait être lancé et piloté à partir du logiciel du FastCAM.

Par ailleurs, pour que le FastCAM puisse être intégré de manière opérationnelle au REPHY, il est nécessaire qu'il devienne un produit industriel. Son transfert est donc actuellement à l'étude. Une première entreprise française a été approchée en ce sens. Toutefois, Fluid Imaging détient actuellement l'essentiel du marché et est très actif en matière de brevet. Une première étude menée par la DDVPE (Direction du Développement, de la Valorisation et des Partenariats Economiques) en 2015 tend à montrer que les brevets déposés par la société américaine n'entraient pas -dans l'état actuel des choses- en conflit avec notre système. Toutefois, il nous semble que Fluid Imaging serait l'entreprise la mieux placée pour la reprise industrielle du FastCAM. Cette piste sera menée en 2016 en concertation avec la DDVPE.

4. Annexes :

4.1. Numérisation d'un échantillon :

4.1.1. Passage d'un échantillon :

4.1.1.1. Installation de la cuve

Dévisser les vis 6 pans de la monture CP09T (Figure 2) à l'aide d'une clé 6 pans 2.5 mm afin de libérer le bloc support de cuve des tiges (Figure 3).



Figure 2 : CP09T/M

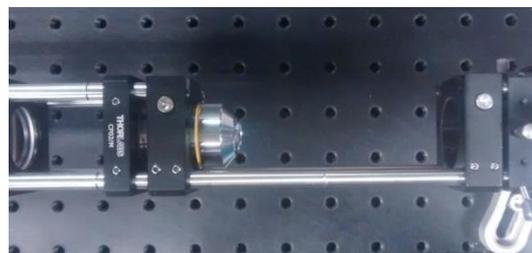


Figure 3 : Banc optique sans le support de cuve



Figure 4 : Support de cuve sans bague de maintien



Figure 5 : Cuve FC100 (Fluid imaging)



Figure 6 : Support de cuve avec cuve



Figure 7 : Système de mise au point micrométrique manuel

Positionner le support de cuve sur un support (Figure 4) pour faciliter la mise en place de la cuve.
Retirer la bague de maintien en position du porte cuve.



Nettoyer au préalable la cuve (FC100, Fluide Imaging, Figure 5) à l'aide d'un papier optique imbibé d'éthanol.
Mettre en place la cuve dans les gorges du support de cuve (Figure 4) et resserrer délicatement la bague à la main. La cuve ne doit plus bouger.

Remettre le bloc support de cuve en place et resserrer à l'aide d'une clé 2.5 mm les vis 6 pans (Figure 6).

4.1.1.2. Réglages avant passage :

Lancer le logiciel FastCAM. Remplir les métadonnées et paramètres d'acquisition (section 4.1.2).

S'assurer de la propreté de la cuve sur l'image de la caméra.

Faire circuler un petit peu d'eau de mer grâce à la pompe péristaltique pour amorcer le système et s'assurer du niveau de gris moyen 180. Si le niveau de gris est trop bas, l'ajuster dans le logiciel en réglant le gain de la caméra (section 4.1.2).

Verser quelques mL d'échantillon et actionner la pompe de manière à avoir quelques objets dans la cuve. Positionner la cuve de manière à ce que les objets soient nets. Si les objets sédimentent et ne restent pas dans la cuve, une pression sur le tuyau permet de les maintenir dans la cuve.

4.1.1.3. Procédure de passage

Prélever 10ml d'échantillon à l'aide d'une pipette et verser le contenu de la pipette sur le côté de l'entonnoir afin de limiter l'apparition de bulles

Actionner la pompe péristaltique pour aspirer le contenu dans l'entonnoir afin que l'échantillon circule à travers la cuve. Pour un écoulement idéal et sans redondance de particules les paramètres de pompage sont :

- vitesse pompe 0,9 ml / min

- tuyau de pompe : tuyau pour pompe péristaltique, Tygon® LMT-55
référence : 9.208 209

Cliquer sur **start capture** l'acquisition s'initialise pour la durée définie dans le logiciel (section 4.1.2.2) et s'arrête automatiquement.

L'entonnoir et le circuit de fluide peuvent maintenant être rincés à l'eau Milli Q. La vanne 3 voies permet de déboucher la cuve si jamais des organismes restent coincés dans la cuve. Pour cela, une seringue est installée sur la troisième voie, ce qui permet de créer surpression ou dépression dans la cuve jusqu'à ce que les organismes bloqués soient partis.



Figure 8 : vanne 3 voies

4.1.2. Logiciel

Dès le lancement du logiciel, l'opérateur indique s'il va effectuer une acquisition d'images auquel cas il doit remplir un formulaire ou effectuer un traitement d'images sur des images déjà acquises.

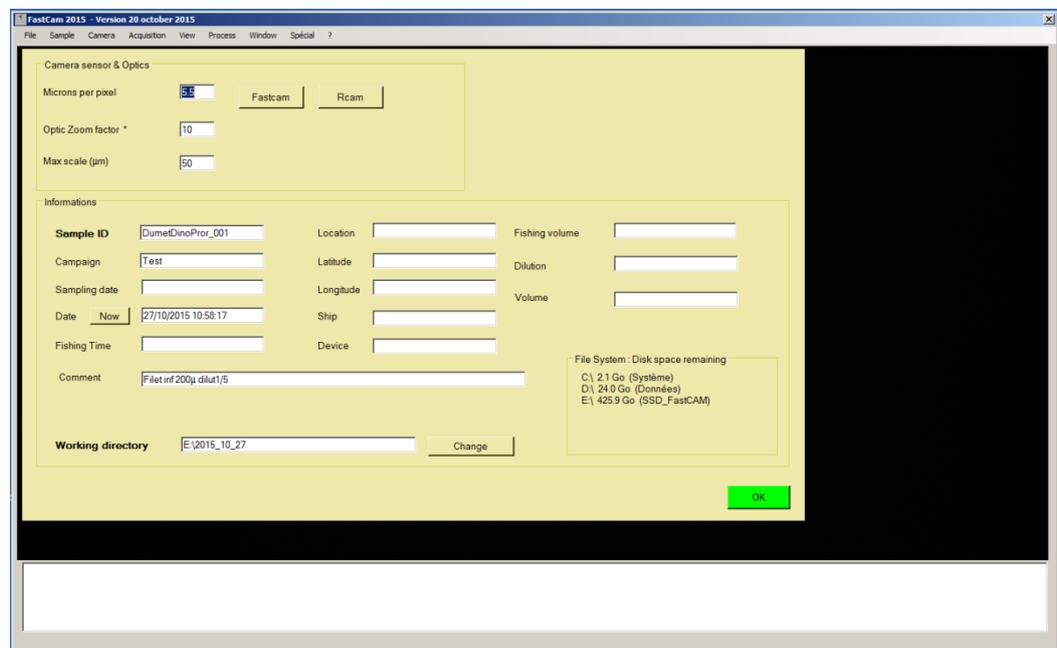


Figure 9: Fenêtre de paramétrage

Formulaire d'identification de l'acquisition

Il est important de renseigner le type de caméra utilisé (ce qui détermine l'échelle en micromètre) et les informations d'identification de l'acquisition.

On observera l'espace disque disponible au chemin du répertoire de travail indiqué.



4.1.2.1. Paramètres d'acquisition de la caméra

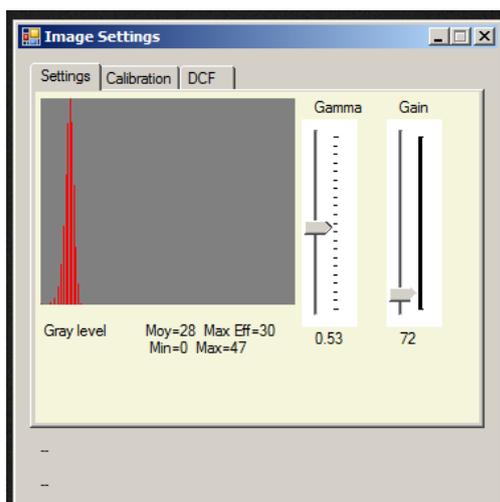


Figure 10: Fenêtre de réglage des niveaux de gris

Un histogramme de niveau de gris aide à ajuster le contraste grâce aux curseurs Gamma et Gain. Notons que la vitesse d'acquisition et le temps d'exposition se règlent par un fichier DCF produit par Matrox Intellicam. Ainsi, l'opérateur ne peut malencontreusement changer les paramètres de la caméra.

Un onglet Calibration permet de vérifier avec un objet étalon que l'échelle pixel-unité réelle est ajustée correctement. Nous utilisons un trou calibré de 50 μ m de diamètre installé sur le support de cuve.

4.1.2.2. Acquisition

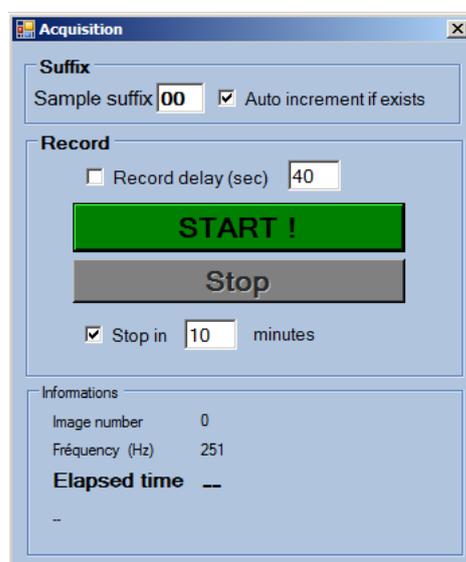


Figure 11: Fenêtre de lancement de l'acquisition

Un suffixe numérique est automatiquement ajouté au nom de l'identifiant de l'échantillon, il peut être incrémenté automatiquement à la suite des acquisitions.

Un délai d'enregistrement effectif peut être appliqué (temps nécessaire entre le lancement de la pompe l'arrivée du fluide dans la cuve).

De même, un temps maximum d'enregistrement peut être appliqué (l'acquisition est très gourmande d'espace disque).

Lorsque l'acquisition démarre, un collage des vignettes des organismes détectés apparaît (Figure 12).

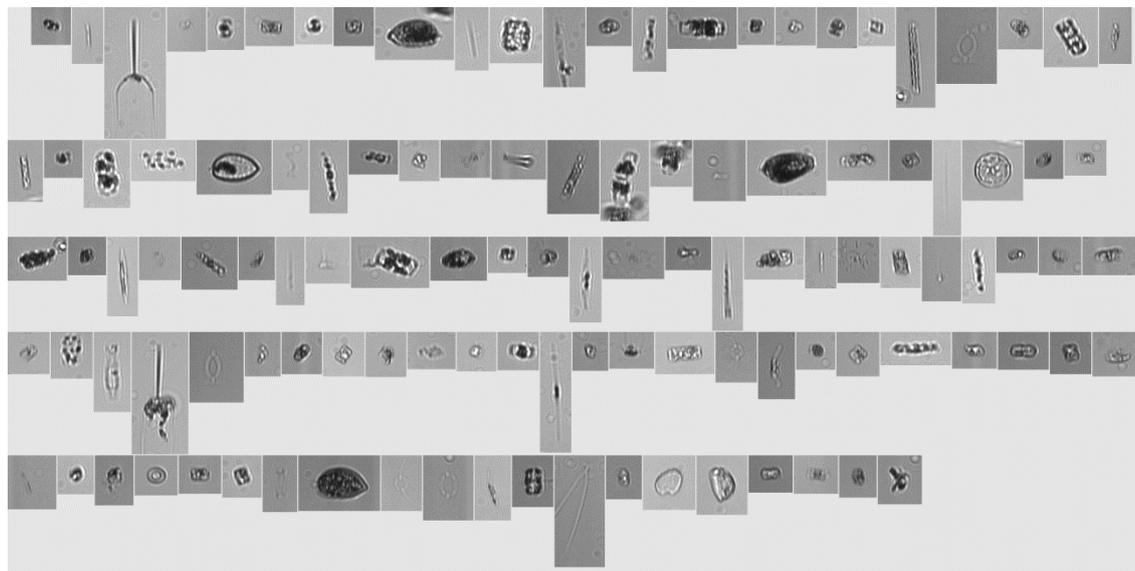


Figure 12: Exemple de collage produit au fur et à mesure de l'acquisition.

4.2. Logiciel de post-traitement

Le post-traitement réalise pour chaque trame :

1. la détection des particules,
2. le calcul des paramètres morphométriques d'intérêt pour la classification,
3. la sauvegarde des données sous forme de fichier texte, vignette et collages.

4.2.1. La détection :

La détection des particules est une étape clé du post-traitement. Pour s'assurer que les objets soient bien détectés de manière automatique, le logiciel permet à l'utilisateur de régler certains paramètres morphométriques et de visualiser directement les particules détectées.

Trois fenêtres de contrôles permettent cette étape :

- La première est « Image Explorer » qui permet grâce à un grand curseur de visionner rapidement toutes les images acquises, d'aller à une image, de visionner pas à pas.
- La seconde « Process » permet d'ajuster les paramètres de sélection des particules et d'exécuter le traitement :
 - o Le seuil, qui isole le niveau de gris de la particule par rapport au fond
 - o Son diamètre de Feret (mini, maxi)
 - o Sa surface (mini, maxi)
 - o Son diamètre (mini, maxi)
 - o Son élongation (mini, maxi)
 - o Un seuil d'écart type de niveau de gris (maxi)
 - o Un niveau de gris moyen d'exclusion



- La troisième « Particle exam » permet de visualiser les particules repérées sur chaque trame et affiche dans un tableau les valeurs de surfaces, coordonnées, diamètres de Feret, l'élongation et écart-type des niveaux de gris pour chaque particule de l'image.

Ces trois fenêtres de contrôle permettent de s'assurer que tous les objets sont bien vignettés mais également de filtrer les objets suivant certains critères. Une fois déterminés, ces paramètres sont fixés et ne doivent plus être modifiés.

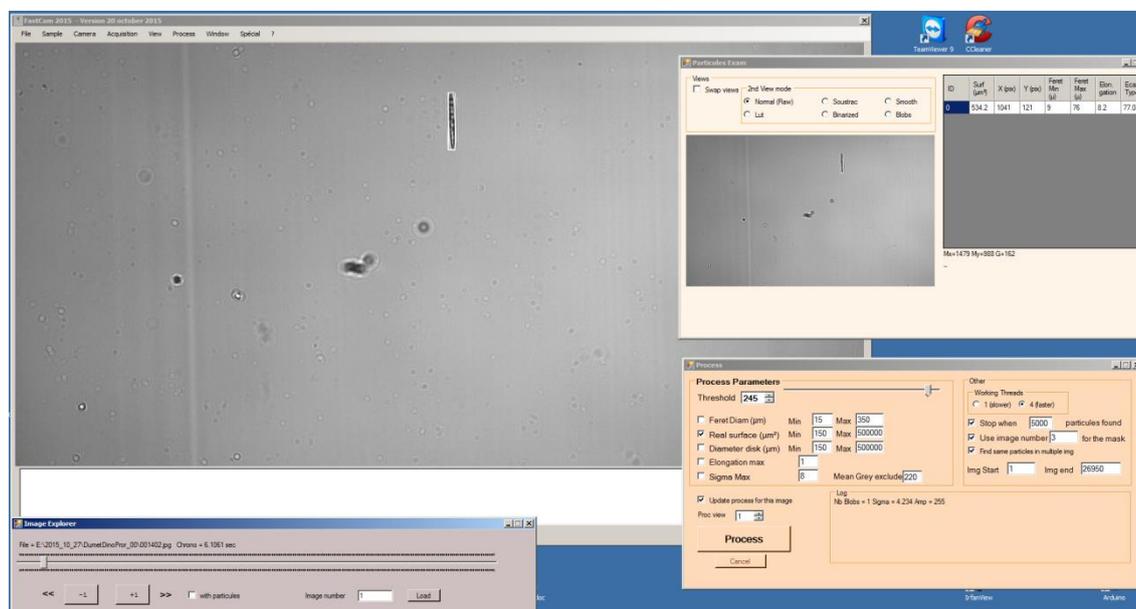


Figure 13: Fenêtre de paramétrage du vignettage

4.2.2. Calcul des paramètres morphométriques :

Avant de lancer le traitement des images, il est nécessaire de fixer le critère d'arrêt du traitement. En effet, en fonction du choix de l'opérateur, le traitement s'arrête lorsque le nombre de particules a atteint un seuil à définir en fonction des applications ou à la fin de l'échantillon.

Il est demandé à l'opérateur de choisir une image de fond. Il est important de bien choisir cette image : celle-ci est soustraite de toutes les autres ce qui permet d'obtenir une image de travail avec un fond d'image uniforme et donc de mieux isoler les particules. Cette image ne doit pas présenter d'objet. Sinon, un objet dit « fantôme » sera alors détecté à chaque image.

La durée du calcul des paramètres dépend du nombre de particules à traiter et du nombre de trames. Elle est en générale de quelques minutes. La liste des paramètres calculés pour chaque particule est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1: Paramètres morphométriques calculés par le logiciel

N°	Nom	Définition
1	Area	L'aire de l'objet
2	Area_exc	L'aire des trous dans l'objet
3	%Area	Le ratio aire des trous/aire de l'objet

4	Area_Based_Diameter	L'aire de l'objet calculée à partir du diamètre
5	MeanGreyImag	Niveau de gris moyen deXXX
6	MeanGreyObjet	Niveau de gris moyen de l'objet
7	ModeGreyObjet	Niveau de gris le plus présent dans l'échantillon
8	SigmaGrey	Ecart-type des niveaux de gris de l'objet
9	MinGrey	Niveau de gris minimum
10	MaxGrey	Niveau de gris maximum
11	SumGrey	Somme des niveaux de gris
12	Breadth	Largeur
13	Length	Longueur
14	Elongation	Longueur/largeur
15	Perim	Périmètre
16	MinFeretDiam	Diamètre de Féret ¹ minimum
17	MaxFeretDiam	Diamètre de Féret maximum
18	MeanFeretDiam	Diamètre de Féret moyen
19	FeretElongation	Elongation calculée à partir des diamètres de Féret maximum et minimum.
20	Compactness	Rapport de l'aire d'un cercle de même périmètre que l'objet et de l'aire de l'objet. Mesure l'aspect sphérique de l'objet. Ce paramètre vaut 1 lorsque l'objet est circulaire et plus sinon.
21	Intercept0	Nombre de fois qu'un objet est interrompu lors d'un balayage horizontal des lignes de l'image
22	Intercept45	Nombre de fois qu'un objet est interrompu lors d'un balayage en diagonale (haut-gauche vers bas-droite) de l'image
23	Intercept90	Nombre de fois qu'un objet est interrompu lors d'un balayage vertical des lignes de l'image
24	Intercept135	Nombre de fois qu'un objet est interrompu lors d'un balayage en diagonale (haut-droite vers bas-gauche) de l'image.
25	ConvexHullArea	L'aire de l'enveloppe convexe ² de l'objet.
26	ConvexHullFillRatio	Ratio de l'aire de l'enveloppe convexe et de l'aire de l'objet.
27	ConvexPerimeter	Périmètre de l'enveloppe convexe de l'objet.

¹ Un diamètre de Féret correspond à la distance entre deux droites parallèles tangentes à l'objet.

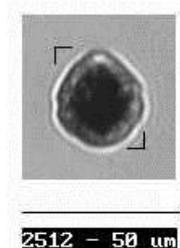
² L'enveloppe convexe est définie comme la forme convexe la plus petite entourant l'objet.



28	N_Number_Of_Runs	Nombre de lignes horizontales permettant de reconstituer l'objet
29	N_Chained_pixels	Nombre de pixel consécutifs permettant de réaliser le tour de l'objet. Il diffère du périmètre car les parties de 1 pixel de large sont comptées deux fois.
30	N_Convex_Hull_Points	Nombre de point du périmètre de l'enveloppe convexe
31	N_Number_Of_Holes	Nombre de trous
32	Transparence	
33	Roughness	Ratio du périmètre de l'enveloppe convexe et du périmètre de l'objet. Mesure l'aspect rugueux et irrégulier de l'objet
34	Rectangularity	Caractère d'un rectangle. Calcule le ratio aire de l'objet par le produit du diamètre de Féret minimum par le diamètre de Féret suivant la direction qui lui est orthogonale.
35	Skewness	Moment d'ordre trois de la distribution des niveaux de gris. Mesure la symétrie de la distribution.
36	Kurtosis	Moment d'ordre quatre de la distribution des niveaux de gris. Mesure l'aspect aplati ou non par rapport à une distribution normale.
37	Fractal Box	La dimension fractale
38	Hist25	Nombre de pixels dont la valeur en niveau de gris est inférieure à 25% du maximum
39	Hist50	Nombre de pixels dont la valeur en niveau de gris est inférieure à 50% du maximum
40	Hist75	Nombre de pixels dont la valeur en niveau de gris est inférieure à 50% du maximum

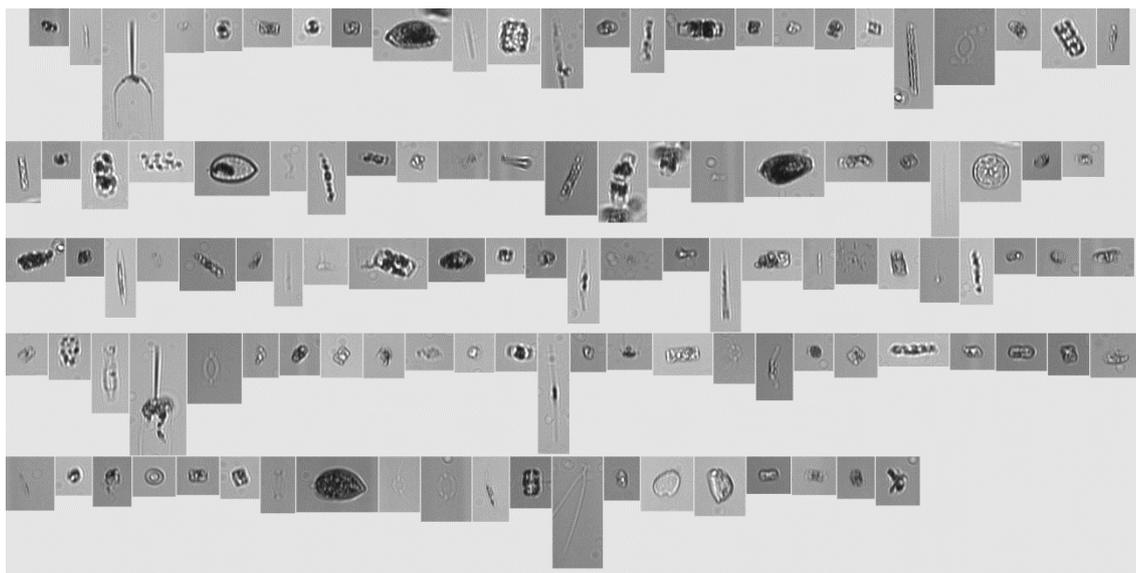
4.2.3. Données produites

Une fois le traitement terminé, les images de chaque particule sont sauvegardées dans un répertoire du même nom que l'échantillon



Dans le même répertoire est généré le fichier texte contenant un entête descriptif de l'échantillon, puis les caractéristiques de chaque particule.

Un répertoire « Raw » contenant un collage de toutes les particules est également généré :

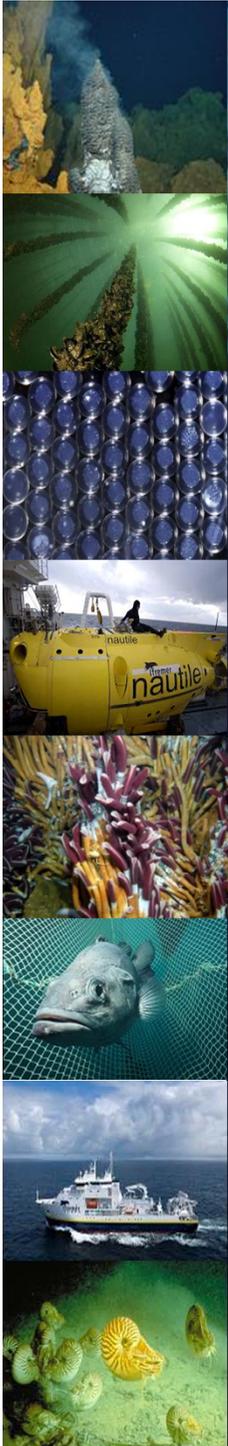


Exemple de collage des images des particules



Le FastCAM

M. Tardivel, B. Forest, M.-P. Crassous, M. Lunven,
M.-M. Danielou, F. Colas.



Contexte

- La vitesse de numérisation du FlowCAM au X10 ne permet pas une analyse en routine.
- Le débit de numérisation est donné :

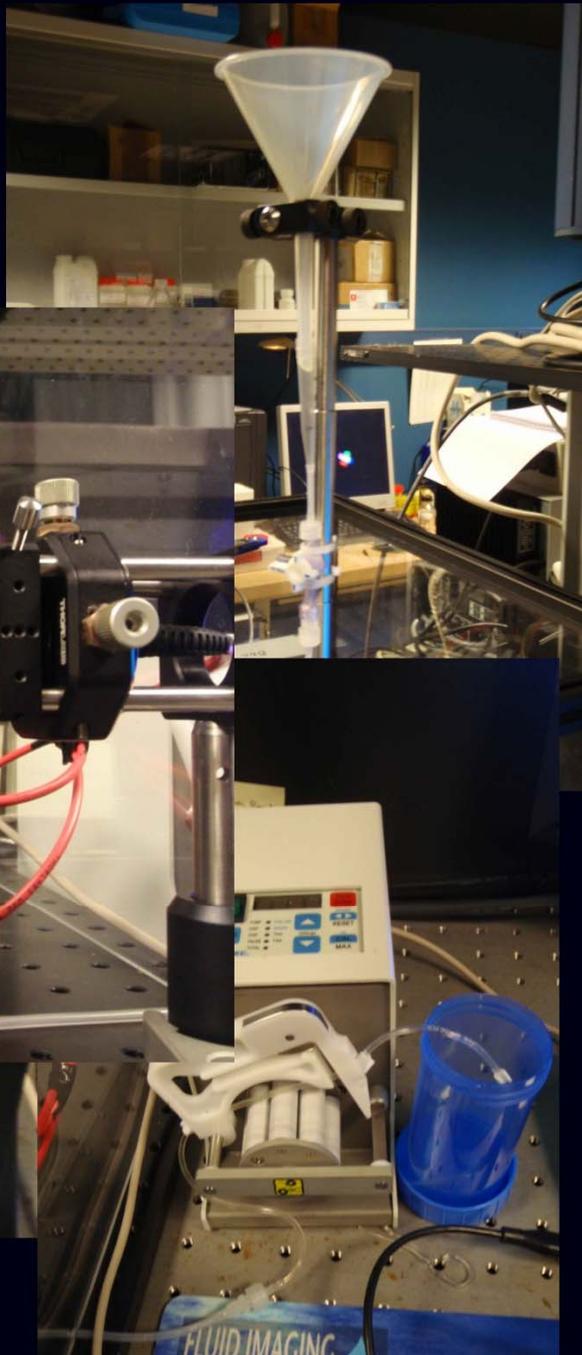
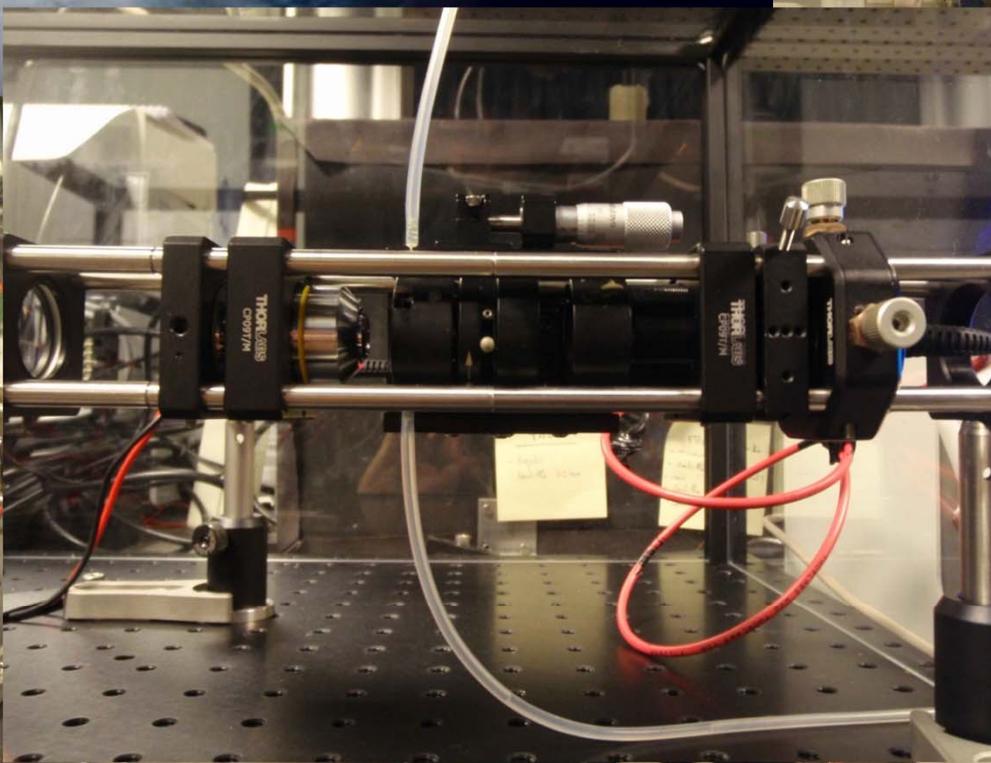
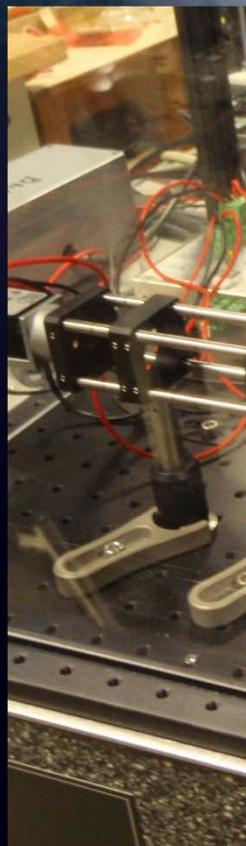
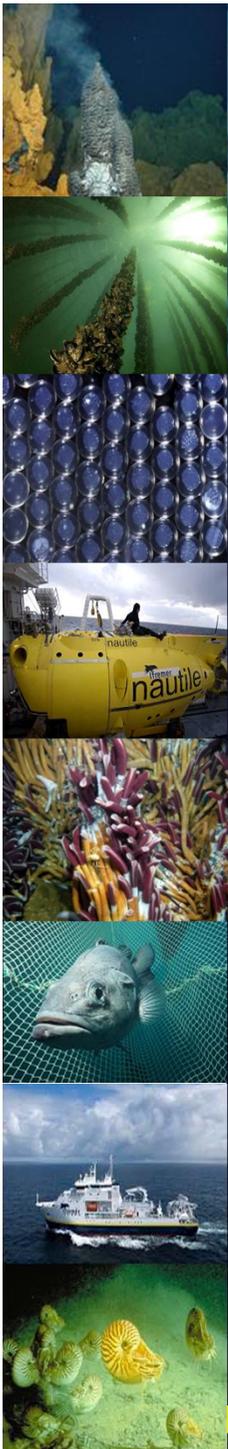
$$\Phi_{\text{num}} = V_i N \quad (1)$$

avec V_i le volume imagé et N le nombre de trames par minute.

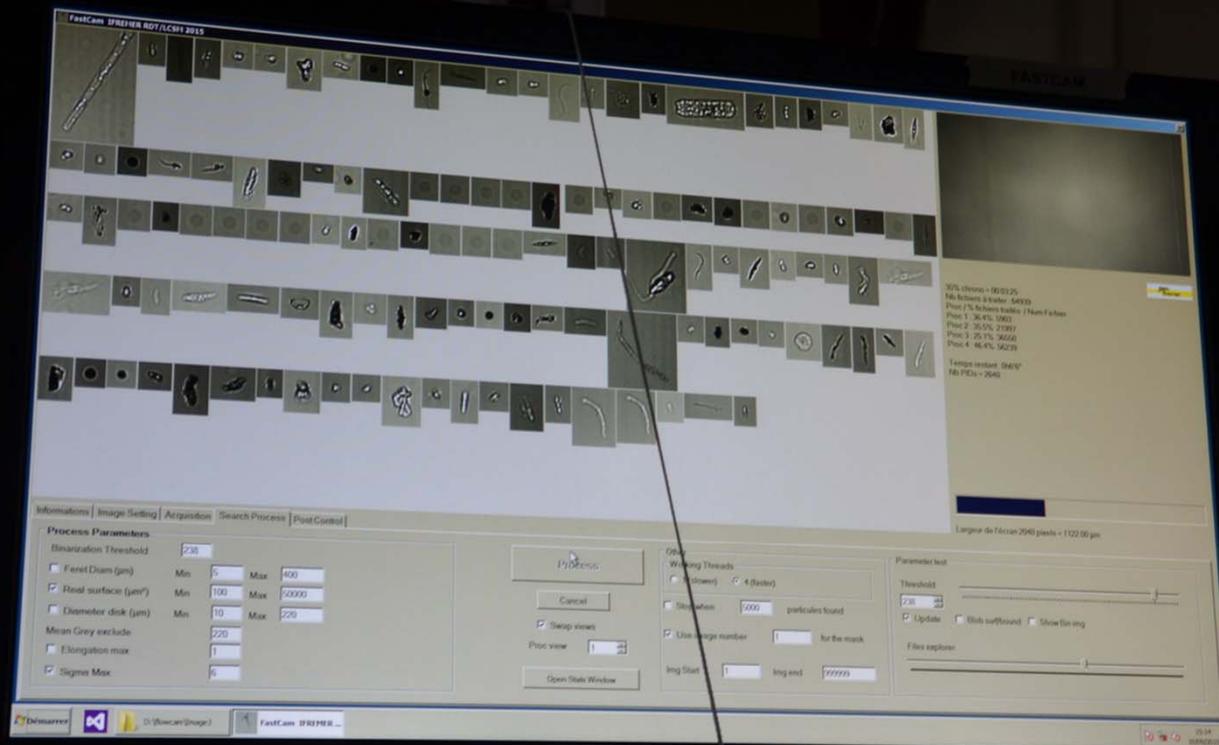
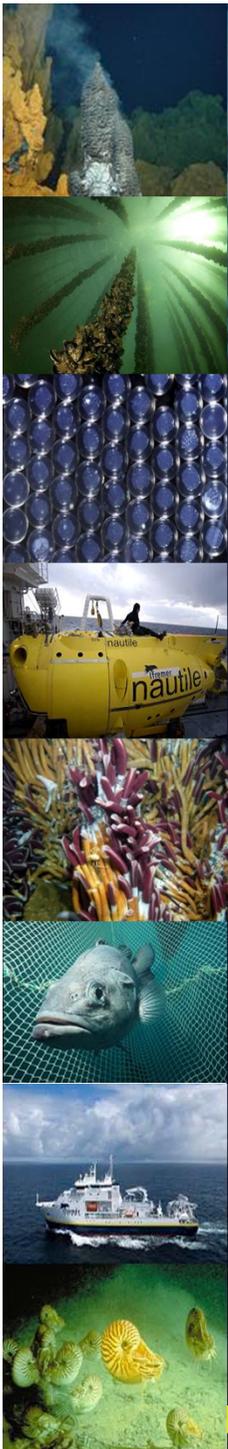
	X4	X10
V_i (μL)	0,9	0,05
Φ_{num} (mL/min)	1,2	0,07
$t_{10\text{mL}}$ (min)	8,3	143



Le FastCAM

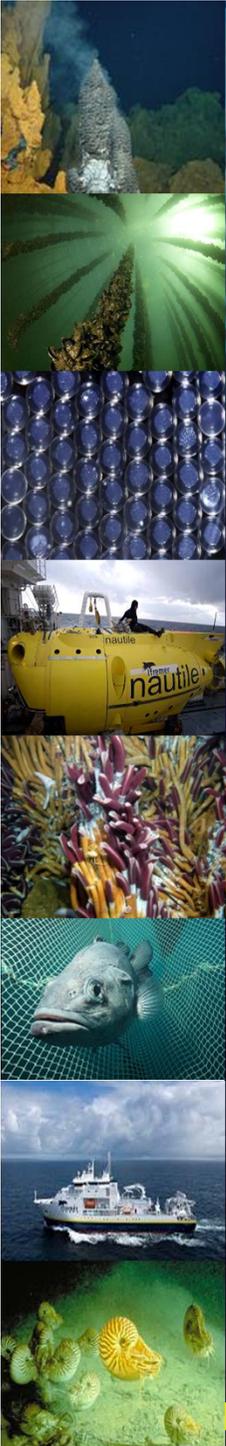


Le FastCAM



Le FastCAM

- Grandissement X10
- Cuves 100 μ m achetées auprès de Fluid imaging
- Vitesse de numérisation jusqu'à 0.7mL/min
- Calcul d'environ 50 paramètres morphométriques sur la base des logiciels Zooprocess et ZoophytoImage à partir de la library MIL (Matrox Imaging Library)
- Temps de calcul <5min pour 5000 particules



Set d'apprentissage

Alexandrium

Asterionella japonica

Cerataulina pelagical

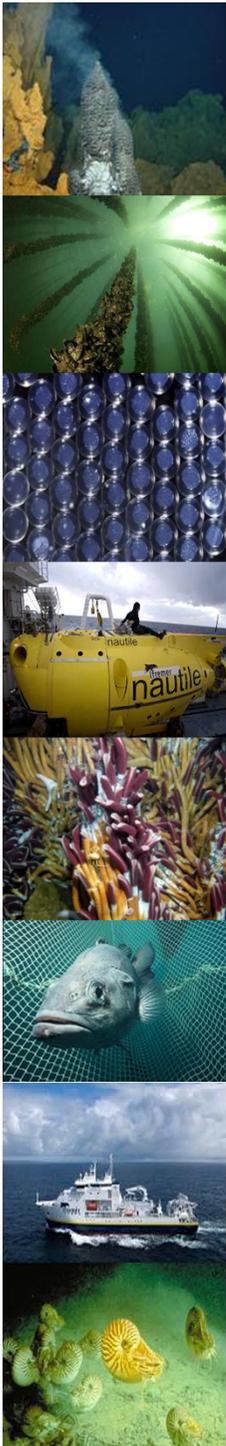
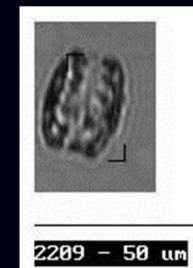
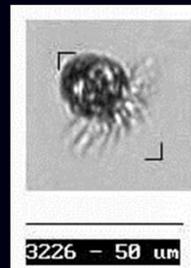
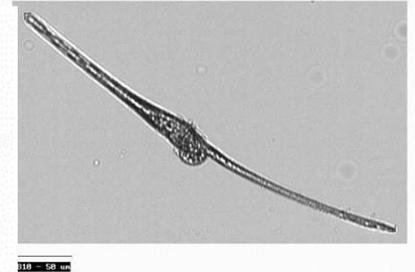
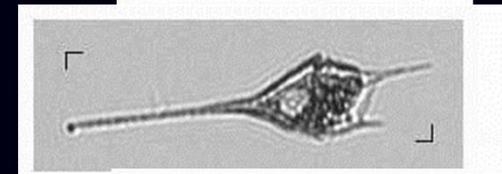
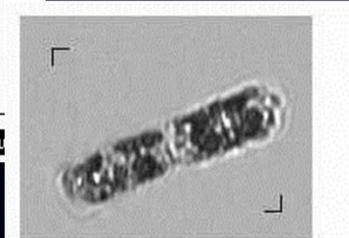
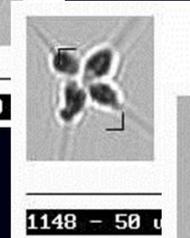
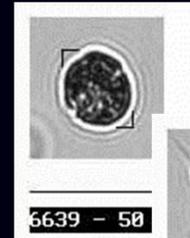
Ceratum furca lineatum

Ceratum fusus

Chaetoceros

Ciliés

Coscinodiscus sp



Set d'apprentissage

Cylindrotheca

Dactyliosolen fragilissima

Dictyocha spp

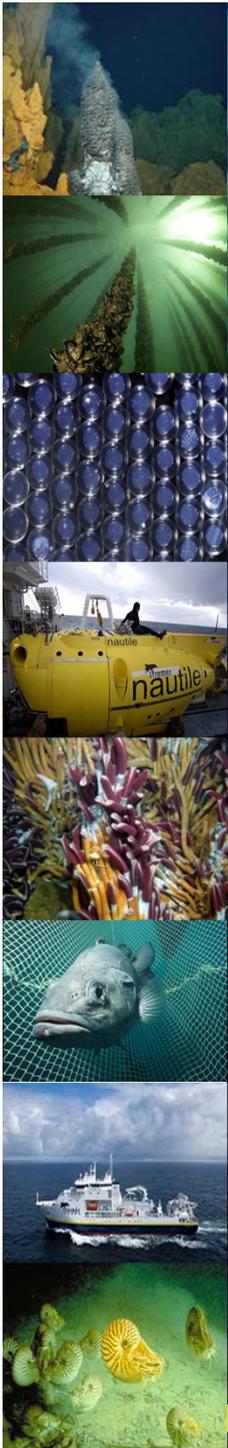
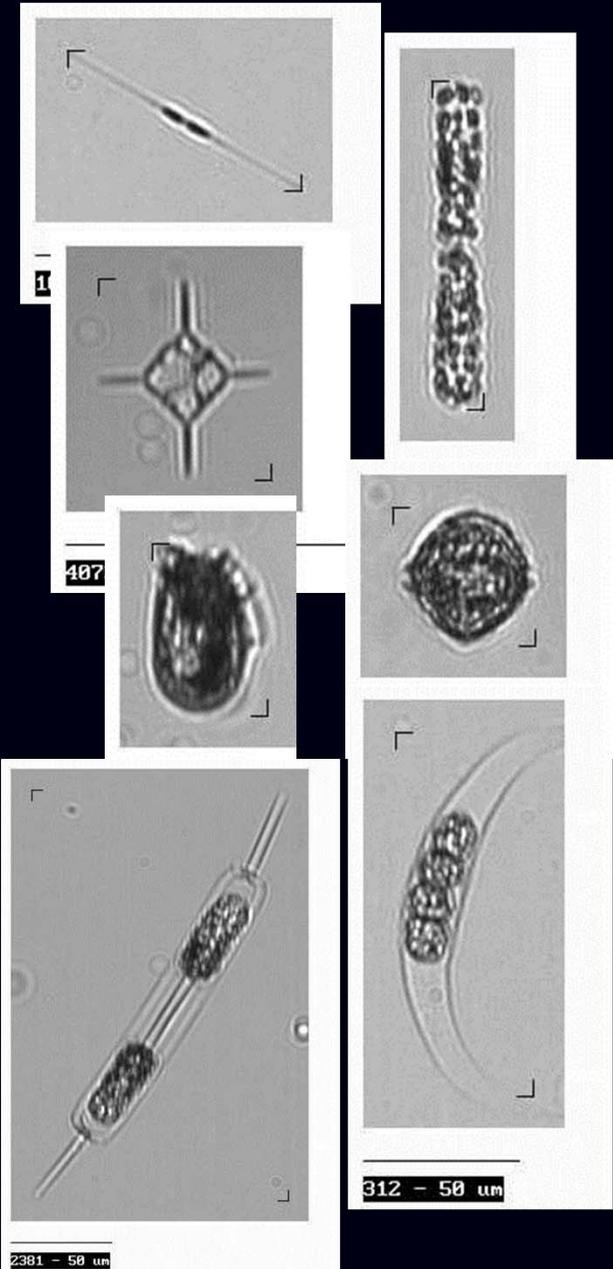
Dinoflagellés indéterminés

Dinophysis spp

Dissodinium

Ditylum_brightwellii

Eucampia zodiacus



Set d'apprentissage

Euglenes

Guinardia delicatula

Guinardia flacida

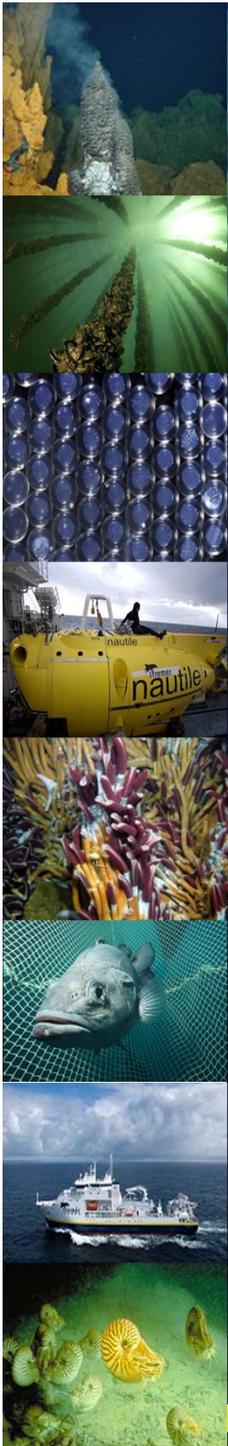
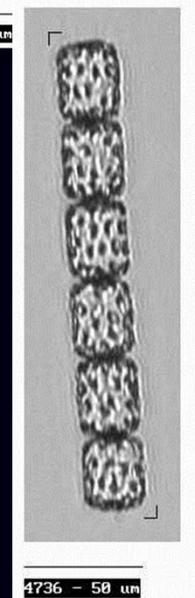
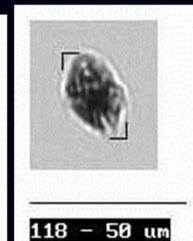
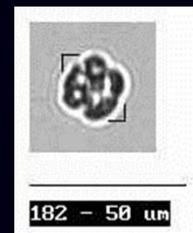
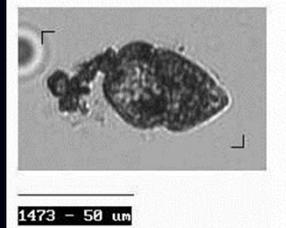
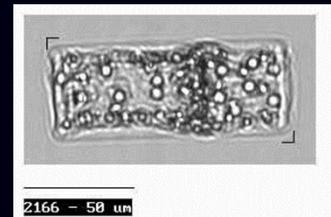
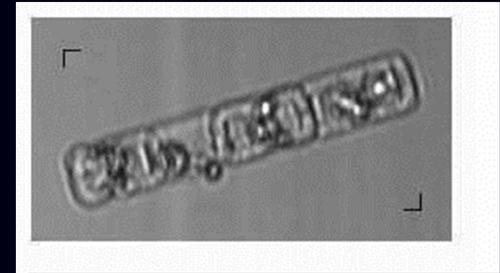
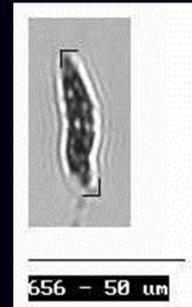
Guinardia striata

Gymnodinium gyrodinium

Heterocapsa triquetra

Karenia mikimotoi

Lauderia-Schroderella



Set d'apprentissage

Leptocylindrus

Melosira sulcata

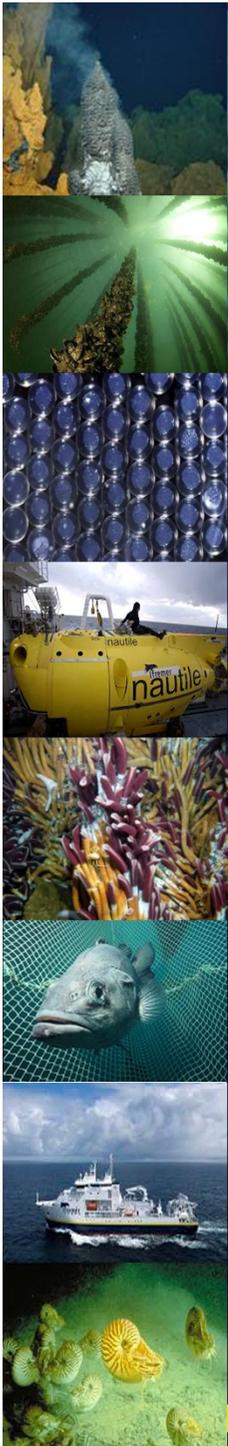
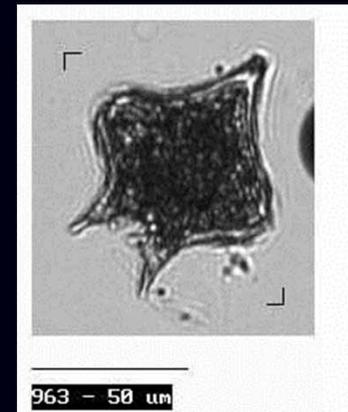
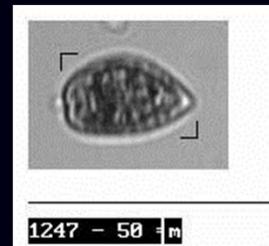
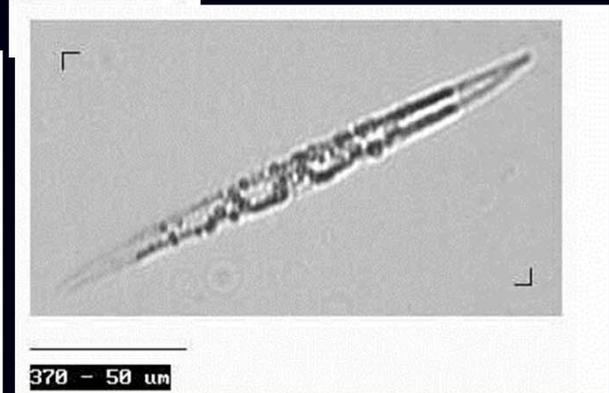
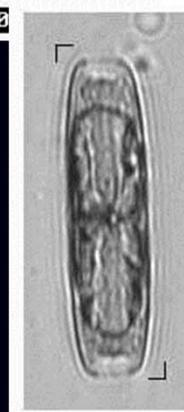
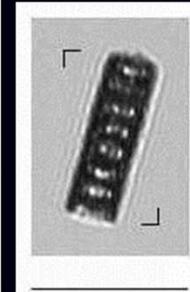
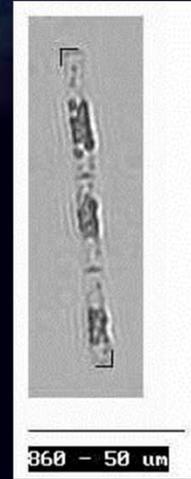
Micro-Zoo

Navicula spp

Pleurosigma – Gyrosigma

Prorocentrum micans

Protoperidinium



Set d'apprentissage

Pseudo-Nitzschia

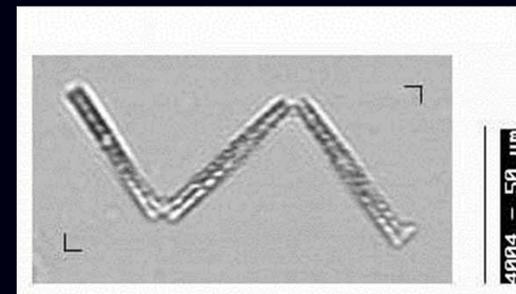
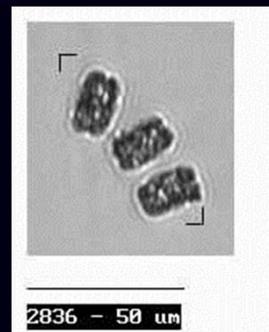
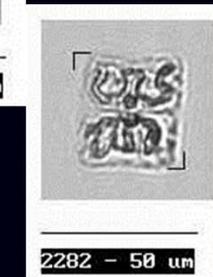
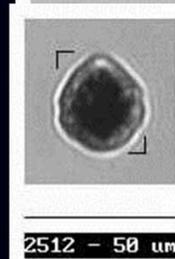
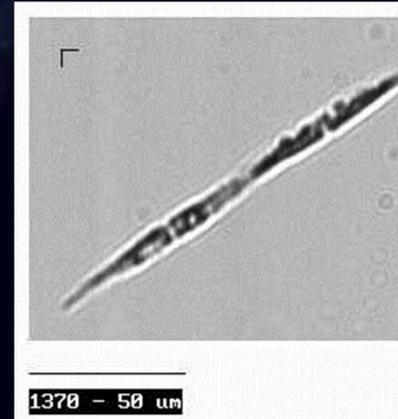
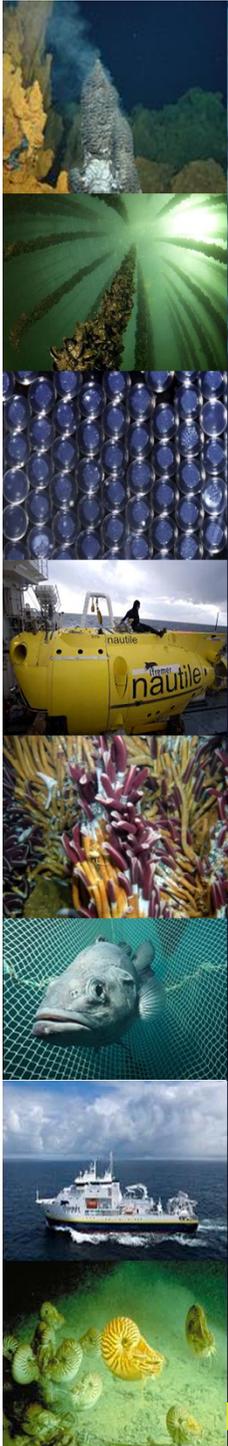
Rhizosolenia

Scrippsiella

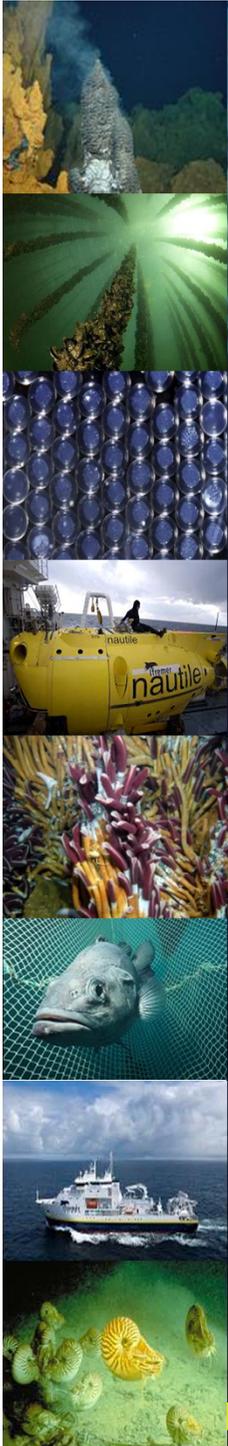
Stauroneis Membranacea

Thalassonema

Thalassosira - Coscinodiscus

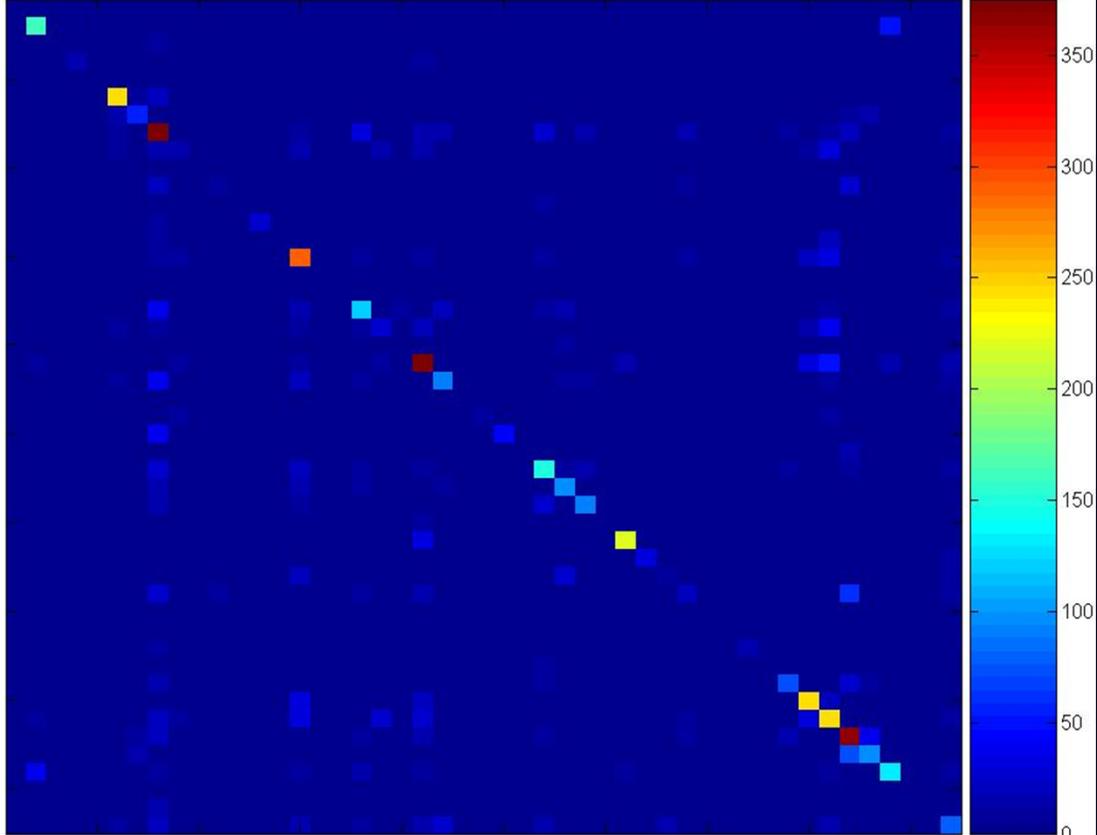


Evaluations du set



Agrégats
 Alexandrium
 Asterionella japonica
 Bulles
 Cerataulina_pelagica
 Ceratium furca lineatum
 Ceratium fuscus
 Chaetoceros
 Ciliés
 Coscinodiscus sp
 Cylindrotheca
 Dactyliosolen fragilissima
 Dictyocha spp
 Dinoflagellés indéterminés
 Dinophysis spp
 Dissodinium
 Ditylum_brightwellii
 Débris clairs
 Débris granuleux
 Débris membraneux
 Débris noirs
 Eucampia zodiacus
 Euglenes
 Feces
 Fibres
 Frustules
 vides
 Guinardia délicatula
 Guinardia flacida
 Guinardia striata
 Gymnodinium-gyrodinium
 Heterocapsa triquetra
 Karenia mikimotoi
 Lauderia- Schroederella
 Leptocylindrus
 Melosira sulcata
 Micro-Zoo
 Mue
 Navicula spp
 Pleurosigma- Gyrosigma
 Prorocentrum micans
 Protoperidinium
 Pseudonitzschia
 Rhizosolenia
 Scrippsiella
 Stauroneis membranacea
 Thalassionema
 Thalassiosira- Coscinodiscus

Agrégats
 Alexandrium
 Asterionella japonica
 Bulles
 Cerataulina_pelagica
 Ceratium furca lineatum
 Ceratium fuscus
 Chaetoceros
 Ciliés
 Coscinodiscus sp
 Cylindrotheca
 Dactyliosolen fragilissima
 Dictyocha spp
 Dinoflagellés indéterminés
 Dinophysis spp
 Dissodinium
 Ditylum_brightwellii
 Débris clairs
 Débris granuleux
 Débris membraneux
 Débris noirs
 Eucampia zodiacus
 Euglenes
 Feces
 Fibres
 Frustules
 vides
 Guinardia délicatula
 Guinardia flacida
 Guinardia striata
 Gymnodinium-gyrodinium
 Heterocapsa triquetra
 Karenia mikimotoi
 Lauderia- Schroederella
 Leptocylindrus
 Melosira sulcata
 Micro-Zoo
 Mue
 Navicula spp
 Pleurosigma- Gyrosigma
 Prorocentrum micans
 Protoperidinium
 Pseudonitzschia
 Rhizosolenia
 Scrippsiella
 Stauroneis membranacea
 Thalassionema
 Thalassiosira- Coscinodiscus

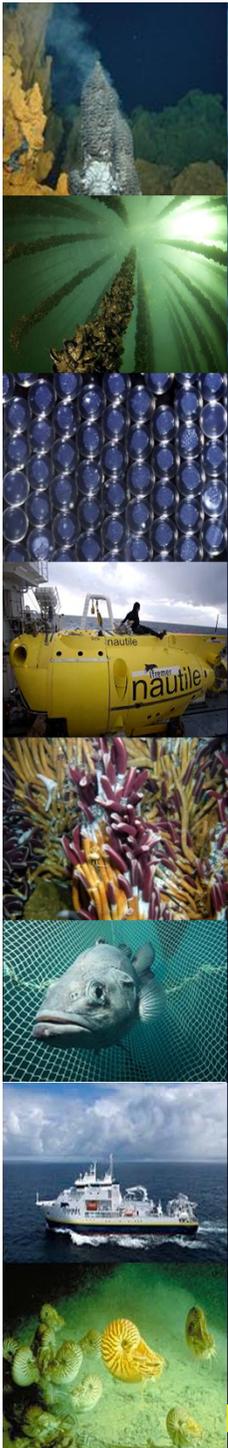


Campagne IPARO

Imagerie Pour l'Analyse Rapide des
micro-Organismes

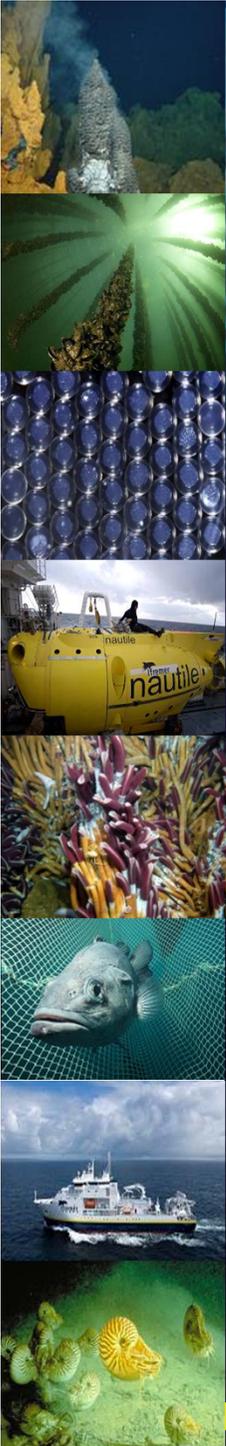
Prélèvements:

1. Niskin
2. Filet
3. Concentrateur automatique sur soie à la sortie du thermosalinomètre.



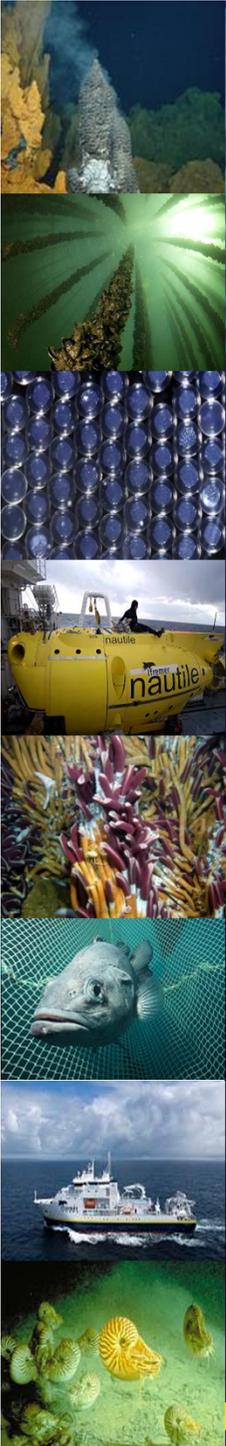
Bilan de la campagne

- Système opérationnel
- Tous les échantillons ont pu être passés.
- Mais:
 - Limitation forte en raison de trop de débris.
 - Impossibilité de numériser un volume supérieurs à 2-3 mL (sinon, plus de 5000 vignettes à valider)
 - Solution à trouver: ZooPhytoImage?



Conclusions et perspectives

- Outils quasi-opérationnels
- Perspectives d'amélioration:
 - Profondeur de champ (besoin d'un objectif à grande profondeur de champ),
 - Calcul des paramètres pendant l'acquisition,
 - Couplage ZooPhytoImage
 - Amélioration/ Nouveau set d'apprentissage.
- Planning dépendra du budget.



Question de fond

Comment faire pour les espèces rares?
Dinophysis?

Peut-on estimer de manière fiable les
abondances des espèces rares à l'aide
d'une technique de classification
supervisée?

