

## *RAPPORT - BIOLOGIE INTÉGRATIVE*

### *Développement d'une interface d'analyse d'images associée à la base de données OMERO*

Application biologique: Effet des régimes lipidiques sur le  
nombre et la morphologie des adipocytes



Carole Rovère, Frédéric Brau

Clémence Belle, Manon Carvalho, Maxence Delannoy  
2019-2020

## **Remerciements**

Nous tenons à remercier chaleureusement Carole Rovère et Frédéric Brau qui nous ont tous deux accompagnés tout au long de ce projet. Vos instructions précises nous ont permis de bien définir les objectifs dès le départ et de pouvoir nous atteler à la tâche. Frédéric, merci pour l'aide précieuse concernant le fonctionnement des macros et le code groovy. Carole, merci pour les explications biologiques. Vous nous avez permis de beaucoup apprendre et c'est votre confiance qui nous a permis de mener à bien le développement de l'interface. Mais par-dessus tout, nous vous remercions pour votre bonne humeur, pour la galette et pour les discussions enjouées, nous avons été plus que ravis de partager ces séances avec vous.

## Table des matières

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>2</b>
<b>Contexte biologique.....</b>	<b>2</b>
• Obésité.....	2
• Régimes alimentaires .....	4
• Analyses des adipocytes suivant les régimes alimentaires.....	4
<b>Collaboration autour de la microscopie.....</b>	<b>6</b>
• Plateforme MICA.....	6
• Base de données OMERO.....	7
<b>Description du projet .....</b>	<b>8</b>
• Besoin d'un nouvel outil informatique .....	8
• Description de la macro utilisée.....	8
• Spécificités fonctionnelles .....	9
<b>Explication du code.....</b>	<b>9</b>
• Fonctions.....	9
• Description du schéma de classes .....	13
<b>Vérifications fonctionnelles .....</b>	<b>14</b>
• Utilisation correcte .....	15
• Utilisation incorrecte .....	16
<b>Tutoriel utilisateur.....</b>	<b>21</b>
• Accès à OMERO en ligne .....	21
• Ajout du script en tant que plugin ImageJ/Fiji .....	22
• Utilisation de l'interface .....	23
<b>Réponse biologique.....</b>	<b>25</b>
• Volume du TA.....	25
• Taille et nombre des adipocytes.....	26
<b>Déroulement du projet .....</b>	<b>28</b>
• Démarche .....	28
• Limitations .....	30
• Améliorations .....	30
<b>Conclusion .....</b>	<b>31</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>32</b>
<b>Sitographie .....</b>	<b>33</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>34</b>

## **Liste des abréviations**

BE : Beurre (Régime)  
CO : Colza (Régime)  
IMC : Indice de masse corporelle  
HFD : High Fat Diet  
Macro : macro programme  
TA : Tissu Adipeux  
TO : Tournesol (Régime)  
SM : Soja/Maïs (Régime)  
ST : Standard (Régime)

## Introduction

Cela fait maintenant plusieurs années que la biologie est étroitement liée à l'utilisation d'outils informatiques [1] afin de réaliser des analyses avec toujours plus de précision et d'efficacité. Or la biologie et l'informatique sont deux disciplines au premier abord très différentes, possédant chacune leur propre code. Cependant, depuis l'introduction de l'informatique dans le domaine de la biologie, les possibilités ne cessent de se multiplier. Nous avons aujourd'hui des bases de données [2, 3, 4], des stockages collaboratifs, des algorithmes d'analyse permettant d'extraire des informations qu'il serait impossible d'obtenir sans ces outils. C'est donc dans ce contexte que ce projet a été mené : une collaboration entre des chercheurs en biologie et des élèves ingénieurs en bio-informatique qui mettent à contribution la compréhension de ces deux champs d'expertise.

Ce projet consiste en l'amélioration d'un outil couramment utilisé par l'équipe du Dr. Rovère permettant d'analyser des images obtenues par microscopie. A l'heure actuelle, la réalisation de ce processus se fait par la succession d'actions semi manuelles exécutées par l'utilisateur. L'objectif principal ici est donc de simplifier cet enchaînement pour le remplacer par un "workflow" automatisé, dont l'utilisateur pourra choisir les paramètres via une interface graphique.

A travers ce rapport seront détaillés à la fois les aspects biologiques et informatiques de ce projet. Cet outil peut être utilisé comme nous le verrons dans différents contextes et pour différentes applications mais nous nous concentrerons sur le travail de l'équipe du Dr. Rovère portant sur l'obésité.

## Contexte biologique

- Obésité

L'obésité est un des problèmes de santé publique très préoccupant de ce siècle. C'est en effet un état pathologique dû à une surcharge pondérale excessive menant à des dysfonctionnements métaboliques permettant l'homéostasie de l'organisme. Cet excédent de tissu adipeux (TA) est constaté via le calcul de l'Indice de Masse Corporelle (IMC), défini comme étant le rapport du poids sur le carré de la hauteur d'une personne [5]. Ainsi, un individu avec un IMC supérieur à 25 kg/m<sup>2</sup> est considéré comme étant en surpoids et ce n'est qu'à partir d'un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> que le terme d'obésité peut être employé. Cet IMC très élevé est cependant atteint par 13% de la population adulte (personnes ayant plus de 18 ans) en 2016, soit 650 millions d'individus. En France, la proportion des personnes obèses s'élevait à 15,3% en 2016. Ces chiffres sont plus élevés en 2019, ce qui est cohérent avec une incidence en constante augmentation depuis ces 30 dernières années, au point qu'elle aurait triplé sur cet intervalle de temps [6] (Prospective Studies Collaboration, 2009; Rahman and Berenson, 2010). S'il n'y a aucun changement par rapport à la tendance actuelle, il est prévu que 57,8% de la population mondiale soit en surpoids ou obèses en 2030 (Kelly et al., 2008).

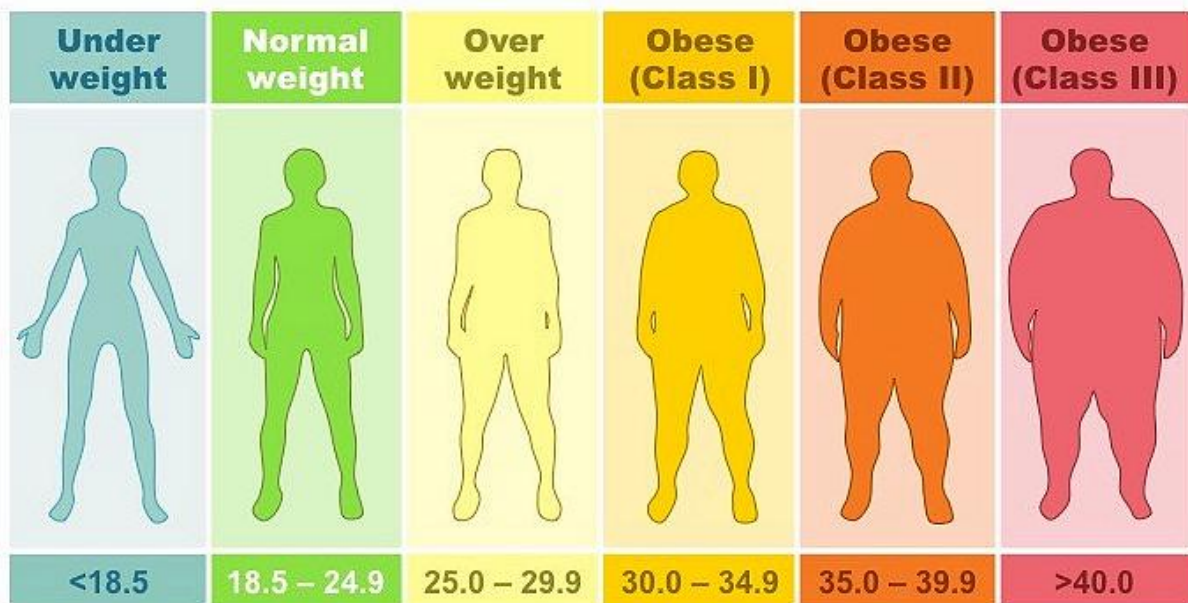


Figure 1. Classification de l'IMC (index de masse corporel)[7]

L'un des faits les plus consternants à propos de l'obésité est son caractère évitable pour une écrasante majorité des cas. Et pourtant, malgré les nombreuses campagnes de prévention et d'informations, le nombre de personnes obèses continue d'augmenter en incluant de plus en plus de jeunes enfants. La situation est telle qu'à l'heure actuelle l'obésité entraîne à elle seule plus de décès que la sous-nutrition. Il existe cependant des moyens pour améliorer cette situation. En effet, mieux gérer son alimentation, faire de l'activité physique (Kotz et al., 2017), consulter un psychologue (Levinge et al., 2020), prendre un traitement pour diminuer le stockage des graisses (Patni et al., 2018) ou bien même la chirurgie sont des solutions envisageables (Angrisani et al., 2015).

La principale cause de cette surcharge pondérale pouvant conduire à l'obésité réside dans un déséquilibre de la balance énergétique <sup>1</sup>. L'obésité est définie par un stockage excessif de graisse dans les adipocytes (cellules du TA), qui va alors informer la région du cerveau majoritairement impliquée dans la régulation de la prise alimentaire : l'hypothalamus. Ce stockage se réalise en modifiant le TA par l'augmentation du nombre d'adipocytes et/ou par l'augmentation de leur volume. D'autres conséquences sont évidemment associées à ce déséquilibre et cette prise de poids : une modification de la régulation hormonale avec une résistance aux effets anorexigènes de la leptine ou encore au contrôle de la glycémie par l'insuline, mais également le développement d'un diabète de type 2 ou l'augmentation du risque de survenue de maladies cardiovasculaires, rénales, hépatiques, articulaires ou encore de cancer (Hruby et al., 2016; Meldrum et al., 2017; Plourde et al., 2014; Rexrode, 1997). C'est l'ensemble des conséquences découlant notamment de cet excès de TA qui rend l'obésité d'autant plus préjudiciable pour l'individu concerné.

<sup>1</sup> Equilibre entre la prise alimentaire et les dépenses énergétiques

- Régimes alimentaires

La principale cause d'obésité, de nos jours, réside dans la combinaison d'une mauvaise alimentation que ce soit en termes de quantité ou de qualité nutritionnelle et d'une tendance à la sédentarité. L'alimentation permet l'apport de trois macronutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme : les glucides, les protéines et les lipides. Ces derniers sont au centre de nombreuses études concernant leur implication dans le développement de l'obésité du fait de leur stockage. En effet, les lipides, en plus d'un rôle structural essentiel, sont des acteurs énergétiques indispensables. Le TA consiste en un stockage de triglycérides dans les vésicules des adipocytes autrement dit un stockage de ressources énergétiques. Parmi les lipides, on peut distinguer les acides gras saturés et insaturés. Au sein de cette dernière catégorie se trouvent notamment les acides gras oméga 3 ( $\Omega 3$ ) et les acides gras oméga 6 ( $\Omega 6$ ), tous deux étant des acides gras essentiels. C'est-à-dire qu'ils ne sont pas synthétisés par l'organisme et sont pourtant indispensables à son bon fonctionnement. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation. Les  $\Omega 3$  ont une action anti-inflammatoire tandis que les  $\Omega 6$  en ont une action pro-inflammatoire. De ce fait, leur rapport est très important afin de limiter l'inflammation de nombreux organes qui est également associée à l'obésité (Katharina Stobbe, 2019; Simopoulos, 2002; Vincent Simon, 2019).

Le rapport recommandé par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) est de 5  $\Omega 6$  pour 1  $\Omega 3$ . Ainsi un rapport inférieur à 5 est considéré bénéfique pour la santé tandis qu'un rapport supérieur est dit délétère. Un rapport très délétère participe à la mise en place de l'obésité et mène à des complications cardiovasculaires ou encore à une inflammation périphérique dite de bas-grade ou également dite de faible intensité. Or plusieurs études s'accordent à dire que les populations des pays occidentaux ont une alimentation menant à un rapport entre 15  $\Omega 6$  pour 1  $\Omega 3$  et 17  $\Omega 6$  pour 1  $\Omega 3$ . Ce rapport très délétère peut être considéré comme l'un des facteurs favorisant le développement de l'obésité. Il est donc nécessaire de mieux caractériser les différents régimes alimentaires existants et leur rapport respectif en  $\Omega 6$  et en  $\Omega 3$  (Katharina Stobbe, 2019; Vincent Simon, 2019).

- Analyses des adipocytes suivant les régimes alimentaires

C'est dans ce contexte que l'une des études menées par l'équipe du Dr. Rovère porte sur la caractérisation des adipocytes de souris C57BL6/J. Ce modèle est utilisé en raison du développement d'une obésité chez les souris nourries avec des régimes hyperlipidiques, aussi appelés High Fat Diet (HFD), associée à une hyperinsulinémie et une hyperglycémie (Wang et al., 2012).

Ces différents groupes de souris mâles âgées de 4 semaines sont, après un temps d'acclimatation au laboratoire, nourris avec différents régimes composés par des proportions variables en  $\Omega 6$  et en  $\Omega 3$  afin de pouvoir tester l'influence qu'ont ces acides gras sur la taille et le nombre d'adipocytes dans différents tissus du TA blanc (sous-cutané, périgonadique, viscéral) et dans le TA brun (tissu impliqué dans la thermogenèse).

Les HFD utilisés sont tous composés de 20% de lipides d'origine végétale mais ont des rapports  $\Omega 6 / \Omega 3$  différents :

- régime COLZA (CO) particulièrement riche en  $\Omega 3$  qui a donc un rapport égal à 2,3 considéré comme bénéfique
- régime SOJA/MAÏS (SM) qui représente le régime alimentaire occidental moyen avec un rapport de 7,3
- régime TOURNESOL (TO) enrichi en  $\Omega 6$  avec un rapport de 17,3 considéré comme fortement délétère.

Le régime contrôle utilisé est appelé STANDARD (ST) et contient lui 5% de lipides avec un rapport de 6,5. Un contrôle positif est également nécessaire, et c'est donc le régime BEURRE (BE) avec 40% de lipides d'origine animale et un rapport de 8,0. Les précédents travaux de l'équipe ont permis de démontrer qu'il s'agit d'un régime fortement obésogène et diabétogène.

	Standard	Beurre	Colza	Soja/Maïs	Tournesol
<b>Energie (kcal/g)</b>	3,4	5,3	4,4	4,5	4,5
<b>Protéines (%)</b>	21,4	19,4	23,0	18,2	20,1
<b>Glucides (%)</b>	51,7	32,1	43,0	46,8	46,8
<b>Lipides (%)</b>	5,1	35,8	20,0	20,0	20,0
<b>Composition en lipides pour les HFD</b>		Beurre anhydre (33,3%) Huile de soja (2,5%)	Huile de Colza (20%)	Beurre anhydre (6,1%) Huile de soja (1,3%) Crisco (6,0%) Saindoux (6,0%) Huile de Maïs (0,5%) Cholestérol (0,15%)	Beurre anhydre (5,1%) Crisco (5,0%) Saindoux (5,0%) Huile de Tournesol (4,77%) Cholestérol (0,15%)
<b>Energie apportée par les lipides (%)</b>	13,5	61	40,5	40,3	40,3
<b>Rapport <math>\Omega 6 / \Omega 3</math></b>	6,5	8,0	2,3	7,3	17,3



Les souris étaient réparties en différents groupes sacrifiés au bout de 12 semaines de régime. L'hypothalamus et les différents TA (sous-cutané, péri-gonadique, brun) ont été prélevés. Ici, nous analyserons uniquement les coupes du TA sous-cutané. Des coupes seront effectuées au microtome d'une épaisseur de 10µm sur ces échantillons paraffinés. Un marquage Hématoxyline-Eosine permettra de mettre en évidence les adipocytes. Les échantillons sont imagés en microscopie à champ clair avec une caméra couleur. Les images RGB sont analysées avec le logiciel ImageJ ou Fiji [8] pour compter et mesurer la surface des adipocytes. La séquence d'analyse a été automatisée pour traiter l'ensemble des images d'un dossier de façon automatique par l'écriture d'un macro programme (macro). Les résultats obtenus permettent de comparer les régimes entre eux et d'identifier l'influence d'un ratio  $\Omega_6 / \Omega_3$  variable sur la taille et le nombre d'adipocytes, soit la structure des différents TA.

## Collaboration autour de la microscopie

- Plateforme MICA

Afin de favoriser la mutualisation des moyens techniques d'observation en biologie cellulaire et tissulaire sur la Côte d'Azur, une plateforme multi-sites de service en imagerie cellulaire a été créée : MICA (Microscopie Imagerie Côte d'Azur). Elle est labellisée par le GIS IBISA depuis 2010 et coordonnée par Dr. Brau (IPMC) et Dr. Arkowitz (iBV). Elle regroupe 41 équipements spécialisés en microscopie et 11 en cytométrie en flux mis à disposition des 8 instituts et équipes suivants :

- Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) de Sophia-Antipolis
- Institut de Biologie de Valrose (iBV) de Nice
- Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) de Nice
- Institut de la Mer de Villefranche (IMEV) de Villefranche sur Mer
- Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA) de Nice
- Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement (IRCAN) de Nice
- Institut Sophia Agrobiotech PACA INRA de Sophia-Antipolis
- L'équipe projet Morphème (INRIA, I3S, iBV)

L'objectif de cette initiative est de pouvoir assister plus de 70 équipes dans leurs expérimentations nécessitant des techniques de microscopie et de pouvoir développer en fonction des besoins de nouveaux protocoles ou méthodologies. La mise en commun de ce matériel et de ces connaissances permet l'accès à de nombreuses approches de microscopie : analyse ultra-structurale en microscopie électronique, imagerie macroscopique, imagerie photonique super-résolue, microscopie à force atomique ou encore analyse haut-débit.

Depuis peu, l'un des outils permettant un échange optimal entre différentes équipes est une base de données en ligne d'images obtenues par microscopie, ce qui en facilite la gestion, le traitement et le partage. Cette base de données a été déployée depuis janvier 2019 grâce au soutien de l'Académie 4 de l'Idex UCA JEDI. Elle est administrée par Dr. Blanchet (Bioinformaticien) à l'Institut Français de Bioinformatique et gérée par F. Bekkouche (responsable informatique du LBDV) et Dr. Brau; et hébergée à l'IN2P3 à Lyon [9].

- Base de données OMERO

Les analyses microscopiques génèrent des dizaines d'images à chaque utilisation. Le poids de ces résultats peut s'élever à plusieurs Gigaoctets pour une seule acquisition, en particulier lorsqu'il s'agit d'acquisitions multi-dimensionnelles ou sur des échantillons de grande taille. Or tout travail scientifique nécessite un échange entre plusieurs collaborateurs. De plus les résultats bruts obtenus doivent être retravaillés et ceci peut-être par une ou plusieurs personnes. MICA a donc eu comme soucis avec l'aide de l'académie 4 de l'Idex de déployer un outil en ligne permettant à tous de gérer leurs images et leur partage lors de projets scientifiques. La base de données OMERO développée par l'équipe du Dr. Swedlow à l'Université de Dundee (Burel et al., 2015) a été choisie. Chaque équipe a un groupe dans lequel les comptes individuels des membres de cette équipe permettent de mettre en ligne leurs résultats et de les partager de manière spécifique au sein de ce groupe ou de groupes de collaboration pour échanger avec des collaborateurs extérieurs à leur équipe. Un accès public est également disponible pour faciliter la communication avec des étudiants par exemple. OMERO permet également l'homogénéisation des formats d'images. En effet, les fabricants d'appareils ont des formats propriétaires qui diffèrent et leur intégration dans OMERO les convertit dans le format Open Microscopy Environment (OME) TIFF qui est un standard de format d'images [10]. OMERO propose un outil d'organisation des images en projets et datasets, une visualisation de chaque image permettant plusieurs modifications et modes de visualisation, l'organisation de plusieurs images en figure scientifique, la liaison de fichiers de résultats annexes à l'image (comme des mesures notées dans un document Excel par exemple). Autant de fonctions qui font de cette base de données un atout indéniable pour le travail des différentes équipes l'utilisant.

De plus, il est possible de se connecter sur OMERO via des logiciels de traitement d'images, comme c'est le cas pour ImageJ, Matlab,...[11].

La base de données est accessible via le lien suivant :

<https://omero.france-bioinformatique.fr/omero/webclient/login/>

## Description du projet

- **Besoin d'un nouvel outil informatique**

La démarche scientifique concernant l'analyse des adipocytes décrite précédemment comprend des étapes d'analyse d'images à effectuer via le logiciel ImageJ. En effet, à l'heure actuelle, les chercheurs doivent se connecter sur OMERO via ImageJ, pour ouvrir en local l'image voulue et l'analyser soit de façon manuelle soit automatique avec un langage de script de type Java sous forme de macro-programmes. Ces macros permettent de réaliser des analyses précises avant de sauvegarder l'image ainsi obtenue sur OMERO grâce à un "plugin" spécial.

Or, le travail de l'équipe du Dr. Rovère nécessite l'analyse de nombreuses images en collaboration avec le Dr. Brau du service d'imagerie de l'IPMC/MICA qui a développé des macros dédiées. L'enchaînement des tâches informatiques entre les scripts et la base de données reste complexe, fastidieux et potentiellement chronophage pour les équipes en biologie. Le Dr. Brau et le Dr. Rovère nous ont proposé un projet qui consiste à automatiser et rendre ergonomique cette analyse. Le but serait de simplifier la démarche de traitement, ce qui, par la même occasion permettrait aux scientifiques d'économiser un temps précieux.

L'objectif est de faire une interface graphique qui regroupe la connexion au compte OMERO du chercheur et l'analyse automatique (appel de la macro d'analyse) des différentes images à traiter avant d'enregistrer les résultats à l'endroit désiré par l'utilisateur. Plusieurs choix devront être faits par l'utilisateur afin de caractériser ses besoins, mais ceux-ci seront à effectuer au lancement de l'interface afin que par la suite, le programme puisse traiter cette demande sans intervention du chercheur. L'avantage principal serait de pouvoir analyser en une seule requête plusieurs images, ce qui comparé à la situation actuelle serait une énorme avancée.

- **Description de la macro utilisée**

L'objectif de la macro que nous utiliserons lors de ce projet, est d'analyser les images de coupes histologiques d'adipocytes en couleur (RGB) et d'en extraire les surfaces individuelles des cellules du tissu permettant ainsi de les dénombrer et d'en relever la surface.

Le traitement de l'image s'effectue en plusieurs étapes :

- Import de l'image brute
- Soustraction du fond (grâce à une fonction spécifique à cette tâche : « subtract background ») qui permet de faire ressortir des objets de taille définie par rapport au fond [12].
- Filtrage avec un filtre de variance qui fait ressortir les membranes cellulaires sur l'image et permet de mieux les distinguer.

- Seuillage sur l'intensité avec la méthode percentile qui permet de passer de l'image en niveaux de gris en une image binaire possédant 2 nuances suivant si la valeur d'origine était inférieure ou supérieure à un seuil déterminé. Cela donne donc une image en noir et blanc.
- Bouchage des trous (grâce à la fonction "fill holes" qui permet de délimiter les "trous" ici représentant les cellules et d'en relever leur surface) [13].
- Analyse finale pour compter le nombre d'adipocytes trouvé et mesure de leur surface

Ainsi le résultat renvoyé par cette macro est une image dont les adipocytes ont été annotés par un numéro ainsi qu'un fichier Excel comportant la surface associée à chaque adipocyte. Cette macro ne peut être effectuée que pour une image à la fois ou sur des dossiers locaux des ordinateurs.

### • Spécificités fonctionnelles

Afin de pouvoir répondre aux besoins de l'équipe du Dr. Rovère, notre outil devra remplir les attentes fonctionnelles listées ci-dessous:

- Se connecter sur un compte OMERO depuis le logiciel avec la possibilité de choisir un port et un hôte, de renseigner un login et un mot de passe
- Sélectionner un dataset sur OMERO contenant les images à analyser
- Sélectionner un dossier en local contenant les images à analyser
- Sélectionner en local le fichier de macro.ijm contenant le code pour analyser les images
- Choisir le suffixe de sortie des résultats obtenus
- Choisir ou créer un dataset sur OMERO qui contiendra les résultats
- Choisir le dossier en local qui contiendra les résultats
- Enregistrer et stocker les résultats générés par la macro à l'emplacement prévu à cet effet : soit en les important en ligne sur OMERO, soit en les conservant dans un dossier en local
- Associer des fichiers à une image de résultat sur OMERO

## Explication du code

### • Fonctions

Le code intégral sera disponible en annexe de ce rapport. Celui-ci se découpe en fonctions qui sont présentées ci-dessous :

La fonction **connect\_to\_omero** permet à un utilisateur d'Omero de se connecter à son compte.

Entrée:

- hst: une chaîne de caractères correspondant à l'hôte
- prt: un entier correspondant au port
- usr: une chaîne de caractères correspondant au nom d'utilisateur
- psw: une chaîne de caractères correspondant au mot de passe

Sortie ([gateway, experimenter, credentials]): un tableau contenant les objets *Gateway*, *ExperimenterData* et *LoginCredentials* associée à la connexion en cours.

La fonction **my\_groups** permet de récupérer la liste des groupes dont un utilisateur d'Omero connecté fait partie. Elle exclut par défaut le groupe "user" d'identifiant 1 qui ne correspond à aucun groupe réel.

Entrée:

- experimenter: un objet *ExperimenterData* associé à la connexion actuelle

Sortie (groupmap): un *LinkedHashMap* correspondant à l'association des identifiants de groupe et noms correspondants

La fonction **my\_projects\_and\_datasets** permet de récupérer la listes des projets et datasets auxquels a accès un utilisateur d'Omero connecté.

Entrée:

- gateway: un objet *Gateway* associé à la connexion actuelle
- context: un objet *SecurityContext* associé à la connexion actuelle

Sortie ([idmap,projname,dataname]): un tableau contenant 3 *LinkedHashMap* correspondant respectivement à l'association des identifiants des projets et datasets associés, l'association des identifiants de projets et noms correspondants, l'association des identifiants de datasets et noms correspondants.

La fonction **get\_credentials\_info** permet d'extraire des informations de connexion à partir d'un objet *LoginCredentials*.

Entrée: credentials: un objet *LoginCredentials* associé à la connexion actuelle

Sortie ([Host, Port, User, Pwd]): tableau contenant 3 chaînes de caractères et un entier correspondant à l'hôte, au port, au nom d'utilisateur et au mot de passe.

La fonction **get\_images** permet de lister toutes les images contenues dans un dataset.

Entrée:

- gateway: un objet *Gateway* associé à la connexion actuelle
- context: un objet *SecurityContext* associé à la connexion actuelle
- dataset\_id: un entier correspondant à un identifiant de dataset

Sortie (images): une *Collection* d'objets *ImageData* correspondant à toutes les images du dataset d'entrée.

La fonction **get\_images\_from\_directory** permet de lister tous les chemins des images contenues dans un dossier.

Entrée:

- **directory**: une chaîne de caractères correspondant à une adresse absolue de dossier local

Sortie (**paths\_images\_ini**): une *ArrayList* de chaînes de caractères correspondant aux adresses absolues des fichiers contenus dans le dossier d'entrée.

La fonction **get\_image\_ids** permet de lister tous les identifiants des images contenues dans un dataset.

Entrée:

- **gateway**: un objet *Gateway* associé à la connexion actuelle
- **context**: un objet *SecurityContext* associé à la connexion actuelle
- **dataset\_id**: un *Long* correspondant à un identifiant de dataset

Sortie (**image\_ids**): une *ArrayList* de *Long* correspondant aux identifiants des images du dataset d'entrée.

La fonction **create\_dataset\_in\_project** permet d'ajouter un dataset à un projet existant.

Entrée:

- **gateway**: un objet *Gateway* associé à la connexion actuelle
- **context**: un objet *SecurityContext* associé à la connexion actuelle
- **newname**: une chaîne de caractères correspondant au nom du dataset à créer
- **projectId**: un entier correspondant à l'identifiant du projet contenant le nouveau dataset

Sortie (**newdataset.getId()**): un *Long* correspondant à l'identifiant du nouveau dataset créé.

La fonction **open\_image\_plus** permet d'ouvrir une image en utilisant le Bio-Formats Importer.

Entrée:

- **HOST**: une chaîne de caractères correspondant à l'hôte
- **PORT**: un entier correspondant au port
- **USERNAME**: une chaîne de caractères correspondant au nom d'utilisateur
- **PASSWORD**: une chaîne de caractères correspondant au mot de passe
- **group\_id**: une chaîne de caractères correspondant à l'identifiant du groupe de l'utilisateur
- **image\_id**: une chaîne de caractères correspondant à l'identifiant de l'image à ouvrir

La fonction **save\_and\_close\_with\_res** permet de sauvegarder en local une image et un fichier de résultat ouverts sous imageJ.

Entrée:

- **image**: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse de sauvegarde absolue de l'image
- **attach**: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse de sauvegarde absolue du fichier de résultat

La fonction **save\_and\_close\_without\_res** permet de sauvegarder en local une image ouverte sous imageJ.

Entrée:

- image: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse de sauvegarde absolue de l'image

La fonction **run\_macro** permet de faire tourner une macro sur des images provenant de Omero et de sauvegarder les résultats obtenus après traitement.

Entrée:

- images: une *Collection* d'objets *ImageData* correspondant aux images à traiter
- Host: une chaîne de caractères correspondant à l'hôte
- Port: un entier correspondant au port
- User: une chaîne de caractères correspondant au nom d'utilisateur
- Password: une chaîne de caractères correspondant au mot de passe
- context: un objet *SecurityContext* associé à la connexion actuelle
- macro\_chosen: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse absolue de la macro
- extension\_chosen: une chaîne de caractères correspondant au suffixe à accoler aux noms des images et fichiers de résultats
- dir: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse absolue du répertoire où sauvegarder les images après traitement
- results: un booléen indiquant si la macro utilisée doit renvoyer un fichier de résultats

Sortie ([paths\_images,paths\_attach]): un tableau contenant deux tableaux de chaînes de caractères correspondants aux adresses absolues des images traitées et des fichiers de résultats associés.

La fonction **run\_macro\_on\_local\_images** permet de faire tourner une macro sur des images provenant de la machine locale et de sauvegarder les résultats obtenus après traitements

Entrée:

- images: une *ArrayList* de chaînes de caractères correspondant aux adresses absolues des images à traiter
- macro\_chosen: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse absolue de la macro
- extension\_chosen: une chaîne de caractères correspondant au suffixe à accoler aux noms des images et fichiers de résultats
- dir: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse absolue du répertoire où sauvegarder les images après traitement
- results: un booléen indiquant si la macro utilisée doit renvoyer un fichier de résultat

Sortie ([paths\_images,paths\_attach]): un tableau contenant deux tableaux de chaînes de caractères correspondants aux adresses absolues des images traitées et des fichiers de résultats associés.

La fonction **import\_images\_in\_dataset** permet d'importer des images sur Omero à partir de sauvegardes locales de ces images.

Entrée:

- paths\_images: un tableau de chaîne de caractères correspondant aux adresses absolues des images à traiter
- Host: une chaîne de caractères correspondant à l'hôte
- Port: un entier correspondant au port
- User: une chaîne de caractères correspondant au nom d'utilisateur
- Password: une chaîne de caractères correspondant au mot de passe
- dataset\_id: un *Long* correspondant à l'identifiant du dataset où importer les images
- gateway: un objet *Gateway* associé à la connexion actuelle
- context: un objet *SecurityContext* associé à la connexion actuelle

Sortie (images\_ids): une *ArrayList* de *Long* correspondant aux identifiants des images importées.

La fonction **upload\_tag\_files** permet d'attacher des fichiers de résultat aux images correspondantes dans Omero à partir de sauvegardes locales.

Entrée:

- gateway: un objet *Gateway* associé à la connexion actuelle
- context: un objet *SecurityContext* associé à la connexion actuelle
- paths\_attach: un tableau de chaînes de caractères correspondant aux adresses absolues des fichiers de résultats
- Images\_Id: une *ArrayList* de *Long* correspondant aux identifiants des images

La fonction **delete\_temp** permet de supprimer la copie locale des fichiers contenus dans un dossier temporaire, ainsi que ce fichier.

Entrée:

- tmp\_dir: une chaîne de caractères correspondant à l'adresse absolue du dossier à supprimer

## • Description du schéma de classes

Pour réaliser ce projet, deux classes ont été définies. La classe **Connexion** correspond à la fenêtre de connexion d'un utilisateur à son compte Omero. Cette classe contient une classe interne permettant de valider les informations de connexion et qui implémente l'interface *ActionListener*, ainsi qu'une méthode pour se connecter à Omero, la fonction `connect_to_omero`.



La classe **Getinfos** correspond à la fenêtre prenant en compte les choix de l'utilisateur concernant les données d'entrée et de sortie. Elle contient de nombreuses classes internes permettant la mise à jour de l'affichage en fonction des choix de l'utilisateur et implémentant les interfaces *ActionListener* ou *ItemListener*. Elle contient également deux classes internes particulières, *ImageTreatment* et *ProgressThread*. La classe *ProgressThread* contient une unique fonction *run*, qui permet de créer une fenêtre de progression à travers l'instanciation d'un objet *ImageTreatment* et d'appeler la méthode *runTreatment* sur cet objet. Cette méthode utilise les fonctions décrites précédemment (à l'exception de *connect\_to\_omero*) afin de réaliser l'import, le traitement et l'export des images selon les modalités choisies par l'utilisateur.

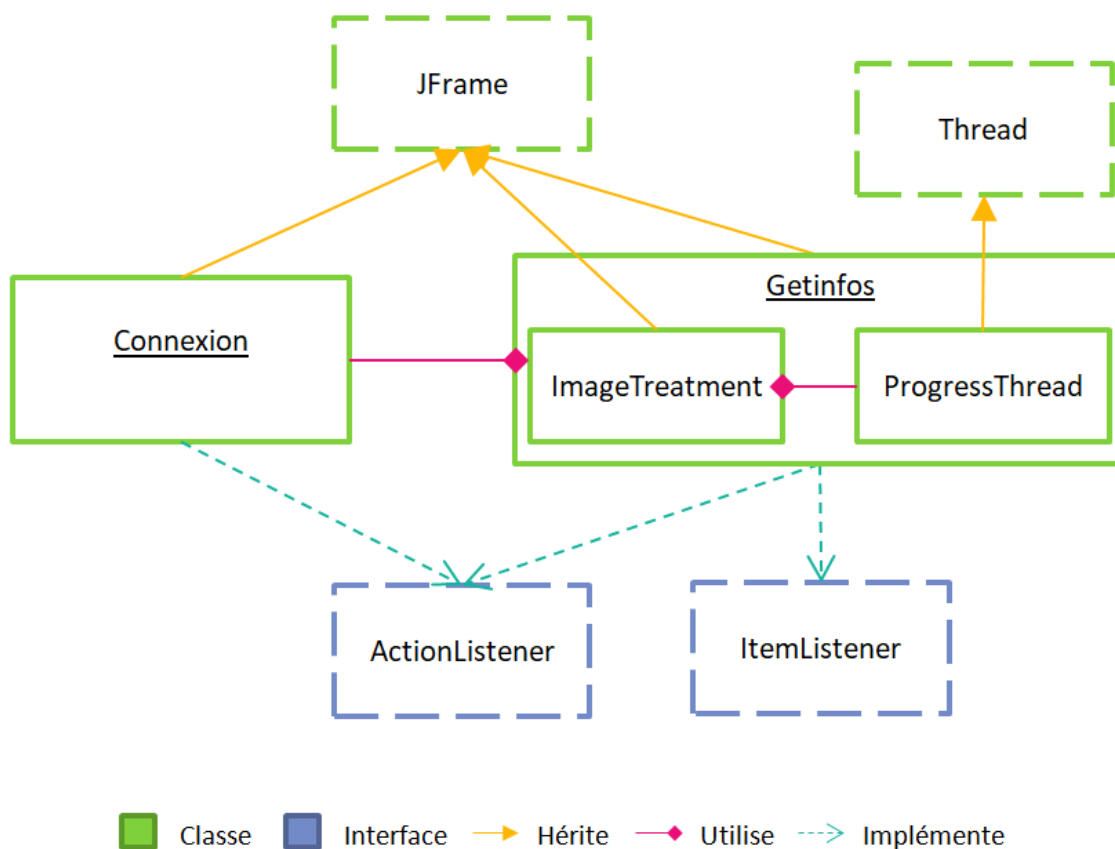


Figure 2. Schéma des classes

## Vérifications fonctionnelles

Une fois notre interface développée, nous avons effectué plusieurs vérifications pour attester de son bon fonctionnement. En effet, nous nous devons de confirmer que notre interface remplit bien les fonctions que nous lui avons attribuées mais également qu'elle est capable de gérer des possibles erreurs d'entrées ou d'utilisation d'un utilisateur.

- Utilisation correcte

**Se connecter sur un compte OMERO depuis le logiciel avec la possibilité de choisir un port et un hôte, de renseigner un pseudonyme et un mot de passe :** lorsque l'utilisateur rentre les bonnes informations, la connexion réussit, la fenêtre de connexion disparaît et la fenêtre permettant de rentrer les informations pour lancer l'analyse s'affiche.

**Sélectionner un dataset sur OMERO contenant les images à analyser :** l'utilisateur peut cocher un ID de projet ainsi qu'un ID de dataset dans les listes déroulantes correspondantes et ainsi sélectionner le dataset voulu. Lors de cette sélection, les noms du projet et du dataset s'afficheront. Le bon déroulement de cette étape pourra se vérifier en regardant les correspondances entre les images de départ et les images de résultat.

**Sélectionner un dossier en local contenant les images à analyser :** l'utilisateur peut, grâce à l'explorateur de fichier, sélectionner le dossier voulu et valider son choix. Le chemin d'accès du dossier sera alors visible dans l'espace prévu à cet effet. Le bon déroulement de cette étape pourra se vérifier en regardant les correspondances entre les images de départ et les images de résultat.

**Sélectionner la macro contenant le code pour analyser les images :** l'utilisateur peut, grâce à l'explorateur de fichier, sélectionner la macro voulue et valider son choix. Le chemin d'accès du fichier sera alors visible dans l'espace prévu à cet effet. L'utilisateur pourra grâce aux fichiers de résultats, constater qu'il s'agit bien de la macro sélectionnée pour l'analyse.

**Choisir le suffixe de sortie des résultats obtenus :** l'utilisateur peut s'il le souhaite modifier le suffixe ajouté par défaut en remplissant le champ prévu à cet effet. Le bon déroulement de cette fonctionnalité peut être constaté avec les noms des fichiers de résultats qui présenteront en suffixe le texte demandé par l'utilisateur.

**Choisir ou créer un dataset sur OMERO contenant les fichiers de résultats :** l'utilisateur peut cocher un ID de projet ainsi qu'un ID de dataset dans les listes déroulantes correspondantes et ainsi sélectionner le dataset voulu. Lors de cette sélection, les noms du projet et du dataset s'afficheront. Une seconde possibilité est également la création d'un nouveau dataset, l'ID projet sera à sélectionner mais l'utilisateur devra par la suite renseigner le nom de ce nouveau dataset. Le bon déroulement de cette étape sera à constater par la présence des fichiers de résultats dans le dataset demandé.

**Choisir un dossier en local contenant les fichiers de résultats :** l'utilisateur peut, grâce à l'explorateur de fichier, sélectionner le dossier voulu et valider son choix. Le chemin d'accès du dossier sera alors visible dans l'espace prévu à cet effet. Le bon déroulement de cette étape sera à constater par la présence des fichiers de résultats dans le dossier demandé.

**Enregistrer et stocker les résultats à l'emplacement prévu à cet effet :** la validation de cette fonctionnalité peut être constatée par la présence des fichiers de résultats dans l'emplacement prévu (dans un dataset sur OMERO ou dans un dossier en local)

**Associer des fichiers à une image de résultat sur OMERO :** la validation de cette fonctionnalité peut être constatée par la présence des fichiers Excel associés aux images de résultats correspondantes.

- Utilisation incorrecte

L'apparition des différentes fenêtres d'erreur qui seront présentées dans cette partie empêche la suite de notre programme de se dérouler. L'utilisateur sera donc bloqué à l'étape où un problème se produit.

**L'utilisateur rentre de mauvais identifiants de connexion :**

- S'il s'agit de l'hôte de connexion, le message d'erreur suivant apparaîtra :

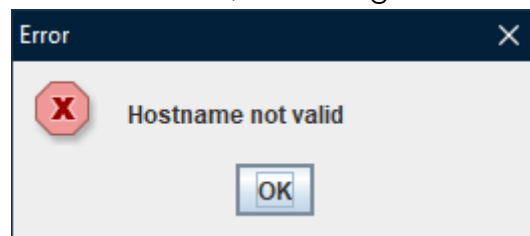


Figure 3. Fenêtre d'erreur – Hôte de connexion invalide

- S'il s'agit du port de connexion, le message d'erreur suivant apparaîtra :

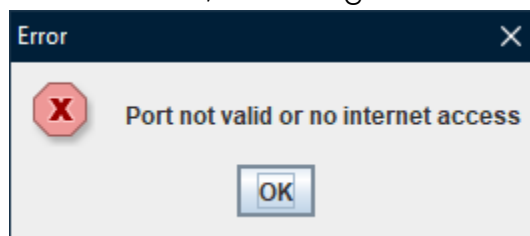


Figure 4. Fenêtre d'erreur - Port non valide

- S'il s'agit du pseudonyme et/ou du mot de passe, le message d'erreur suivant apparaîtra :

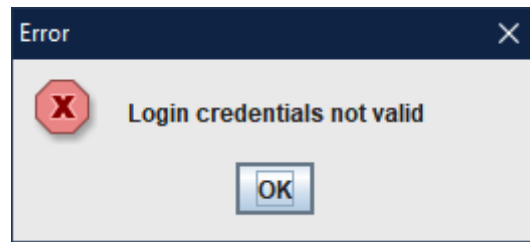


Figure 5. Fenêtre d'erreur - Pseudonyme et/ou mot de passe invalide(s)

#### **Aucun accès à internet :**

Lors de sa tentative de connexion, l'utilisateur verra apparaître le message d'erreur suivant :

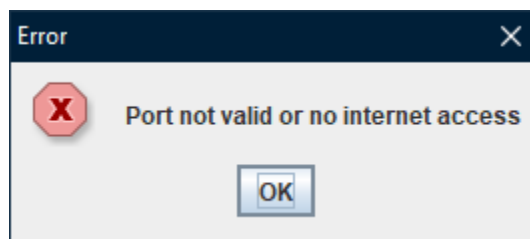


Figure 6. Fenêtre d'erreur - Aucun accès à Internet

#### **L'utilisateur ne renseigne pas les ID pour accéder à un dataset sur OMERO contenant les images à analyser :**

Si ce cas se produit, la fenêtre d'erreur suivante apparaîtra :

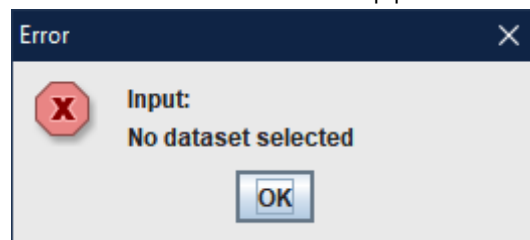


Figure 7. Fenêtre d'erreur - Aucun ID de dataset sélectionné

#### **L'utilisateur ne renseigne pas le dossier en local contenant les images à analyser :**

Si ce cas se produit, la fenêtre d'erreur suivante apparaîtra :

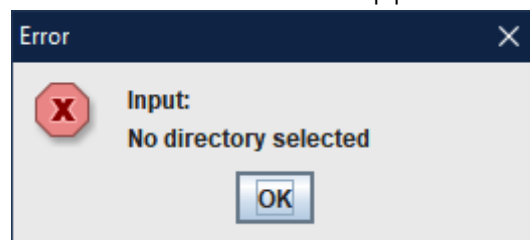


Figure 8. Aucun dossier local rentré

#### **L'utilisateur renseigne un dossier en local ne contenant pas uniquement les images à analyser mais également des fichiers d'autres types ou il renseigne un dossier en local/dataset sur OMERO ne contenant aucune image :**

Si ce cas se produit, les fenêtres d'erreur suivantes apparaîtront :

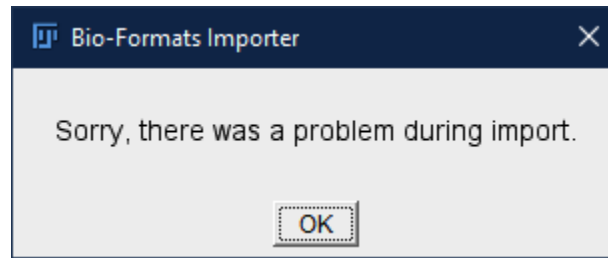


Figure 9. Fenêtre d'erreur - Erreur d'import

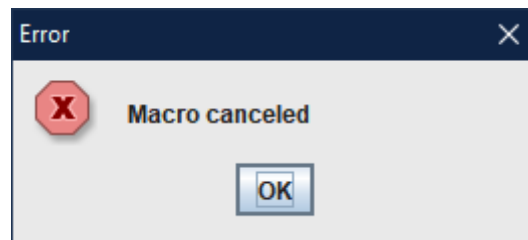


Figure 10. Fenêtre d'erreur - Annulation de la macro

**L'utilisateur quitte l'explorateur de fichiers avant d'avoir sélectionné un dossier en local contenant les images à analyser :**

Si ce cas se produit, la fenêtre d'avertissement suivante apparaîtra :

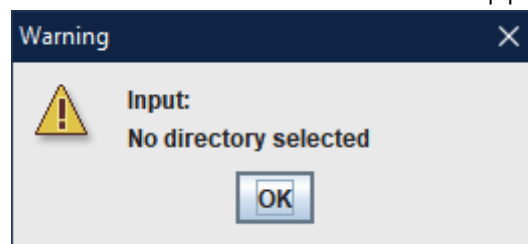


Figure 11. Fenêtre d'avertissement - Lorsque l'utilisateur quitte l'explorateur de fichiers sans avoir rentré de résultats

**L'utilisateur ne renseigne pas la macro pour analyser son dataset :**

Si ce cas se produit, la fenêtre d'erreur suivante apparaîtra :

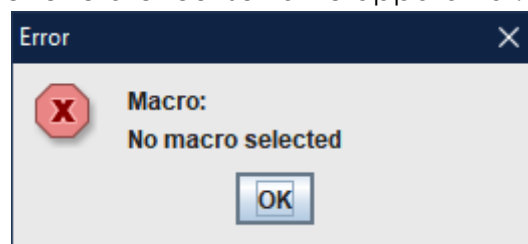


Figure 12. Fenêtre d'erreur - Aucune macro sélectionnée

**L'utilisateur sélectionne un fichier qui n'est pas une macro pour analyser son dataset:**

Dans ce cas, plusieurs erreurs inhérentes au logiciel ImageJ apparaîtront suivant le type de fichier sélectionné par l'utilisateur et la dernière fenêtre d'erreur qui s'affiche sera :

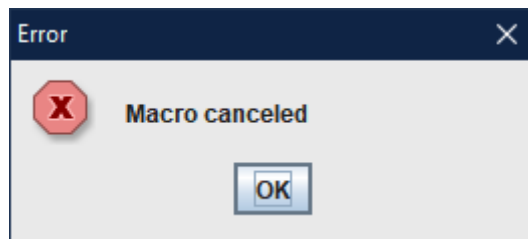


Figure 13. Fenêtre d'erreur - Macro annulée

**L'utilisateur n'indique pas que la macro renvoie des images résultats et un fichier de résultats lorsque c'est le cas :**

Dans ce cas, plusieurs erreurs inhérentes au logiciel ImageJ apparaîtront suivant le type de fichier sélectionné par l'utilisateur et la dernière fenêtre d'erreur qui s'affiche sera :

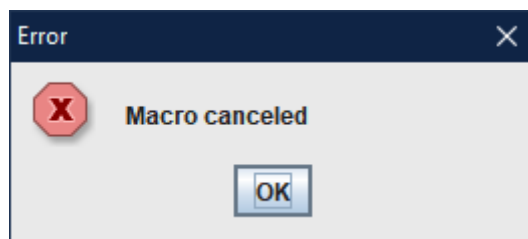


Figure 14. Fenêtre d'erreur - Macro annulée

**L'utilisateur indique que la macro renvoie un fichier de résultats (de type Excel par exemple) lorsque ce n'est pas le cas :**

Dans ce cas, la fenêtre d'erreur "Macro Error" inhérente au logiciel ImageJ apparaîtra. Il faudra alors cliquer sur OK pour que l'analyse continue. Cette fenêtre apparaîtra à chaque traitement d'image par ImageJ.

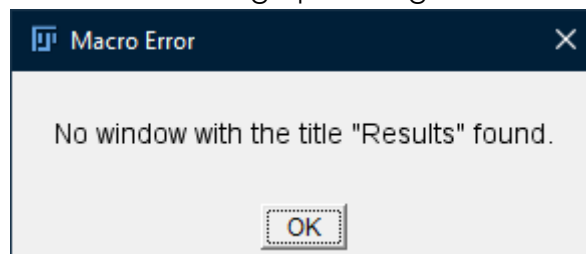


Figure 15. Fenêtre d'erreur - Pas de fichier de résultat trouvé

**L'utilisateur ne choisit pas de lieu d'enregistrement des fichiers de résultats :**

Si ce cas se produit, la fenêtre d'erreur suivante apparaîtra :

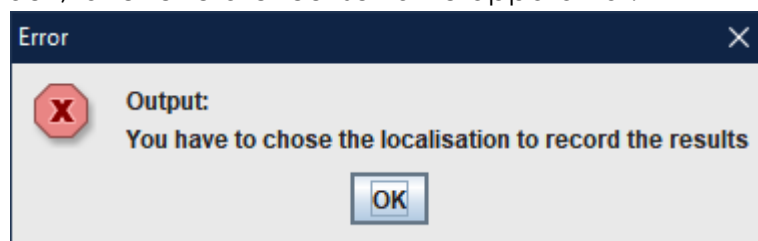


Figure 16. Fenêtre d'erreur - Aucun répertoire de sortie indiqué

**L'utilisateur ne renseigne pas de dataset de sortie qui contiendra les fichiers de résultats :**

- S'il s'agit d'un dataset existant qui n'est pas renseigné, la fenêtre d'erreur suivante apparaîtra :

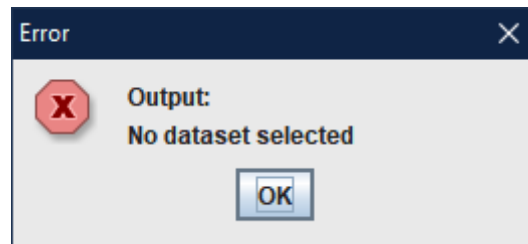


Figure 17. Fenêtre d'erreur - Aucun dataset de sortie sélectionné

- S'il s'agit d'un nouveau dataset à créer et qu'aucun nom n'est renseigné ou projet indiqué, la fenêtre d'erreur suivante apparaîtra :

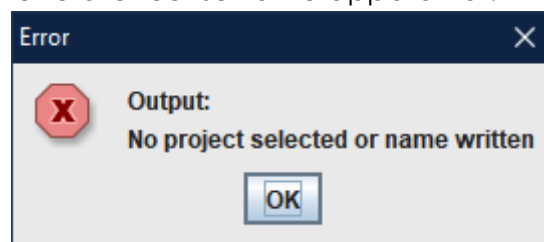


Figure 18. Fenêtre d'erreur - Absence de remplissage de toutes les cases pour la création d'un nouveau répertoire

**L'utilisateur ne renseigne pas de dossier de sortie qui contiendra les fichiers de résultats :**

Si ce cas se produit, la fenêtre d'erreur suivante apparaîtra :

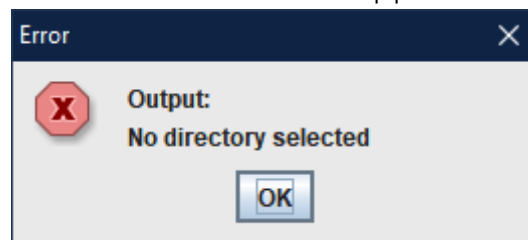


Figure 19. Fenêtre d'erreur - Aucun répertoire de sortie sélectionné

## Tutoriel utilisateur

- Accès à OMERO en ligne

Afin de récupérer certaines informations nécessaires pour le bon fonctionnement de notre outil, l'utilisateur doit tout d'abord se connecter en ligne sur OMERO. Les options de connexion sont accessibles via le lien suivant :

- <http://unice.fr/plateformes/mica/acces-rapide-a-votre-compte-omero>

L'utilisateur doit alors choisir l'option à gauche de l'écran pour accéder à son compte personnel.



### Accès rapide à votre compte Omero

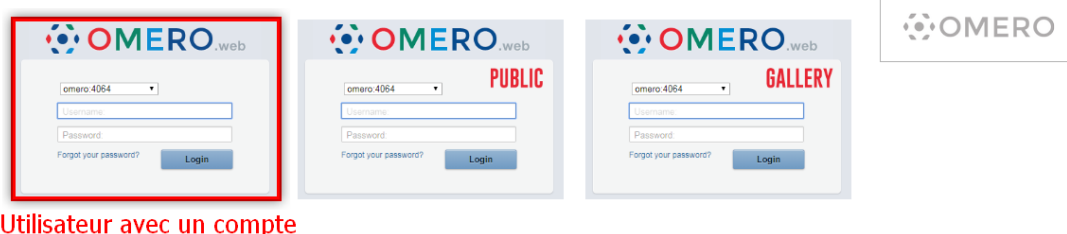


Figure 20. Page de connexion à Omero

Afin de se connecter, l'utilisateur est redirigé vers une fenêtre lui demandant de rentrer son pseudonyme ainsi que son mot de passe.

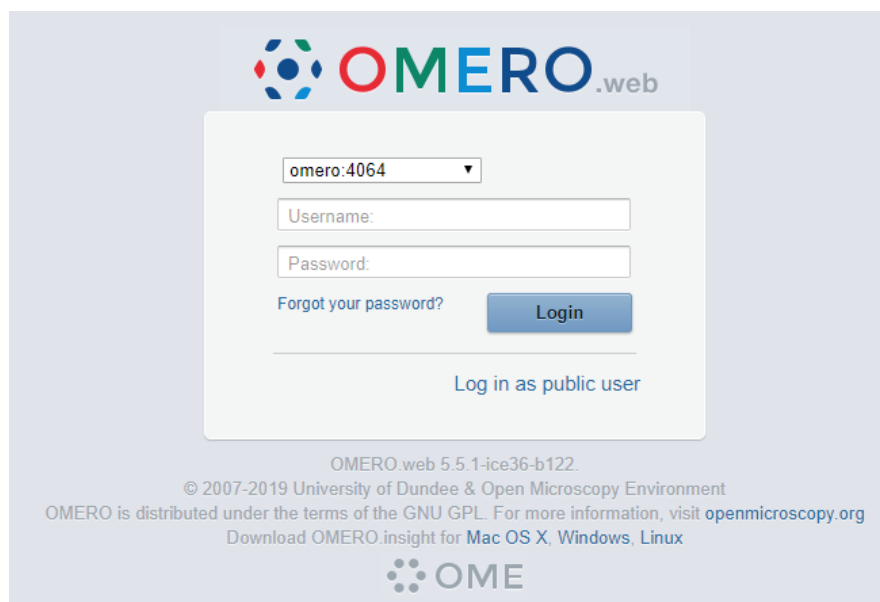


Figure 21. Page d'entrée des logins

Une fois connecté, l'utilisateur a accès à sa propre page d'accueil où il peut retrouver ses différents projets et datasets dans le menu à gauche de l'écran. L'utilisateur aura besoin de 2 informations : l'ID du projet dans lequel se situe le



dataset ainsi que l'ID du dataset. Ces informations sont disponibles lorsque l'on sélectionne le projet/dataset voulu, les ID sont affichés sur la droite de l'écran.

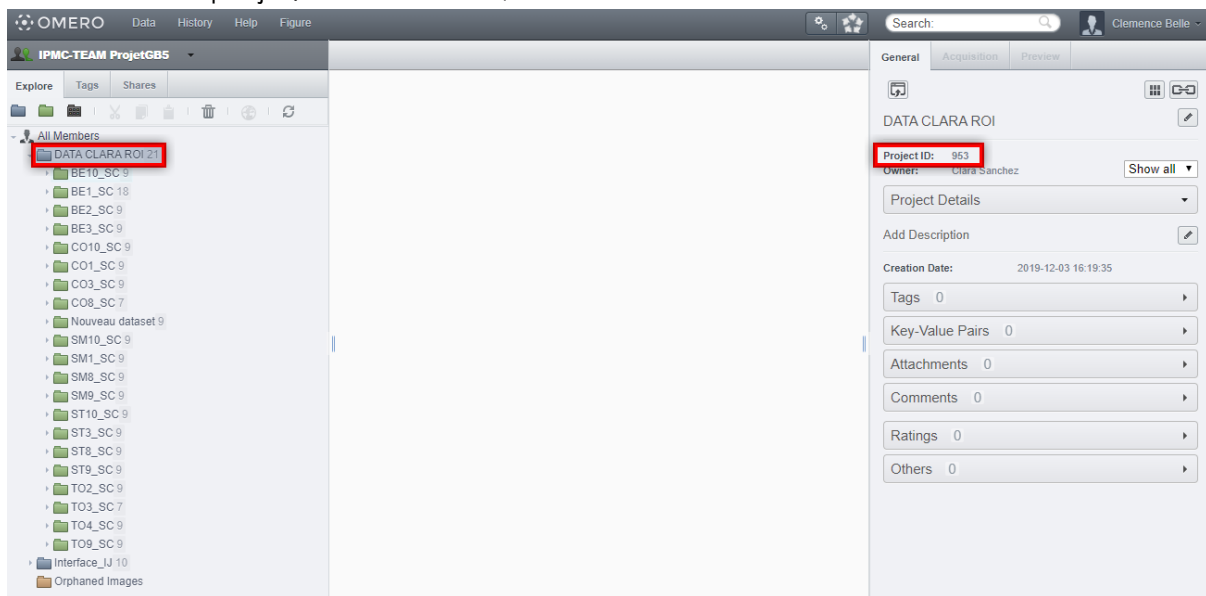


Figure 22. Ecran accueil utilisateur - A gauche tous ces répertoires de dataset et à droite des informations sur chaque projet

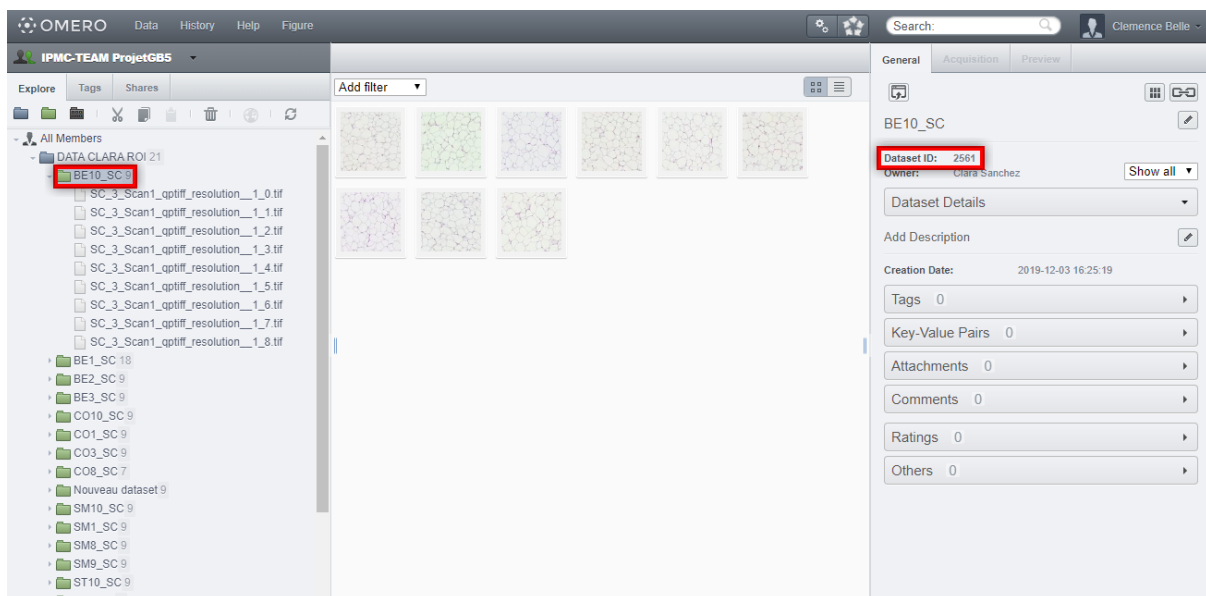


Figure 23. Sélection d'un dataset contenant plusieurs images

- Ajout du script en tant que plugin ImageJ/Fiji

Avant de pouvoir utiliser notre script, l'utilisateur devra installer le plugin Omero (OMERO.imagej-5.5.1) sur imageJ. Actuellement, le serveur utilise la version 5.5.1 d'Omero, il est donc nécessaire d'avoir installé une version compatible [14].

Afin de pouvoir utiliser le script comme un plugin, l'utilisateur devra déplacer le fichier ".groovy" dans le répertoire "plugins" de l'application ImageJ/Fiji. Une fois l'application lancée, dans l'onglet "Plugins" le nom de notre programme s'affichera. En cliquant sur le nom, la fenêtre de connexion s'affichera également.

- Utilisation de l'interface

Une fois lancée, l'utilisateur verra tout d'abord apparaître une fenêtre de connexion où il lui sera demandé de renseigner son pseudonyme et son mot de passe mais également le port et l'hôte utilisés pour cette connexion. Ces derniers sont pré-remplis par défaut afin de faciliter la connexion pour l'utilisateur, mais si besoin, il a la possibilité de les changer. Il devra cliquer sur le bouton "Login" pour se connecter.

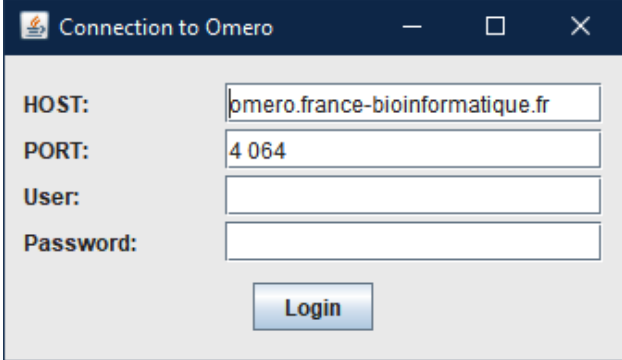
The image shows a window titled "Connection to Omero". Inside, there are four labeled input fields: "HOST:" containing "omero.france-bioinformatique.fr", "PORT:" containing "4 064", "User:", and "Password:". Below these fields is a blue button labeled "Login". The window has standard OS window controls (minimize, maximize, close) in the top right corner.

Figure 24. Fenêtre de connexion

Une fois l'étape de connexion franchie avec succès, une seconde fenêtre s'ouvrira. Elle présentera les différentes options disponibles pour permettre l'analyse d'images. Pour pouvoir remplir cette fenêtre, l'utilisateur devra au préalable connaître l'ID du projet et l'ID du dataset récupérés en ligne précédemment.

Tout d'abord, l'utilisateur devra indiquer son groupe de travail, puis s'il veut choisir des images contenues dans un dataset en ligne sur OMERO ou un fichier contenant des images en local sur son poste. S'il choisit en ligne, il devra alors sélectionner l'ID du projet puis l'ID du dataset. Ces derniers sont à choisir dans un menu déroulant comportant les ID projets et ID datasets appartenant à l'utilisateur. S'il choisit un dossier en local, un explorateur de fichier s'ouvre pour que l'utilisateur puisse sélectionner le dossier voulu. Ce dossier ne devra comporter que des images. Les noms correspondant au projet et au dataset seront affichés une fois l'ID sélectionné, ce qui permet à l'utilisateur d'être sûr de sa sélection.

L'utilisateur devra ensuite sélectionner un fichier de macro, à nouveau via un explorateur de fichier. De plus, les macros peuvent renvoyer différents types de résultats. A l'heure actuelle notre interface gère les macros renvoyant des résultats de type image. Une option peut être cochée si la macro renvoie en plus des fichiers Excel rattachés à chaque image.

La dernière partie de cette fenêtre concerne les fichiers de sortie. L'utilisateur devra choisir un suffixe à ajouter au nom de l'image d'origine utilisée pour nommer l'image de sortie. L'utilisateur devra pour finir choisir le lieu d'enregistrement : soit en ligne sur OMERO, soit en local sur son poste. S'il choisit en ligne, il devra sélectionner soit un dataset existant (en renseignant donc l'ID du projet ainsi que celui du dataset) ou un nouveau dataset qui ne contiendra donc uniquement que les fichiers de résultats de l'analyse. Pour cela il faudra choisir l'ID du projet et donner le nom souhaité pour ce nouveau dataset. S'il choisit en local, il y aura à nouveau la possibilité de sélectionner un dossier via un explorateur de fichiers.

Une fois l'ensemble des champs complété, l'utilisateur pourra lancer l'analyse en appuyant sur le bouton "Submit".

Choice of input files and output location

**Group**

group ID: 463 IPMC-TEAM ProjetGB5

**Input**

Where to get files to analyze : ☒ Omero ☐ Local

project ID: 953 DATA CLARA ROI dataset ID: 2570 ST3\_SC

**Macro**

Macro file

☐ The macro returns a results file (other than images)

**Output**

Suffix of output files : \_macro

Where to save results : ☐ Omero ☐ Local

Submit

Figure 25. Fenêtre d'entrées de tous les paramètres requis pour simplifier le travail

Une fois lancé, notre outil gèrera par lui-même l'accès aux images en ligne ou en local, leur analyse avec la macro demandée par l'utilisateur, la génération de fichiers de résultats : images en .tif et potentiellement d'autres fichiers (comme des fichier Excel) et pour terminer l'enregistrement sous le bon nom et dans le bon dossier de ces résultats, qu'il s'agisse d'un dataset sur OMERO ou d'un dossier en local.

## Réponse biologique

Nous avons donc utilisé notre nouvelle interface afin de pouvoir analyser les résultats précédemment obtenus par l'équipe. Pour rappel, il s'agit d'étudier l'influence des différents régimes sur la taille et le nombre d'adipocytes présents dans le TA des différentes souris. Pour ce faire, nous avons, via l'interface, analysé les différents datasets contenant 9 coupes de TA chacun en leur appliquant une macro permettant de compter le nombre d'adipocytes présents dans la coupe ainsi que de renseigner leur taille. Les coupes étudiées sont au même grossissement et au même format ce qui permet de pouvoir comparer les résultats entre eux.

Pour rappel, les différents régimes étudiés sont Standard (ST), Beurre (BE), Colza (CO), Soja/Maïs (SM) et Tournesol (TO). Les caractéristiques des ces régimes ont été décrites précédemment.

- Volume du TA

Afin de pouvoir compter les adipocytes et déterminer leur surface, nous devons nous appuyer également sur le volume du TA calculé selon le protocole décrit en Annexe 1. Suite à d'autres expériences réalisées par l'équipe, ce dernier ainsi que le rapport de masse grasse sur masse maigre ont été obtenus. Ainsi nous pouvons affirmer que les souris nourries avec le régime ST ont un TA moins volumineux que ceux des souris nourries avec les autres régimes à l'exception de TO (Annexe 1). En effet, le régime BE engendre un TA particulièrement volumineux (environ quatre fois plus qu'avec le régime ST). Ceci confirme bien BE en tant que contrôle positif : les souris deviennent obèses avec un excédent de masse grasse. Les conditions CO et SM entraînent elles aussi une prise de volume du TA mais dans une moindre proportion (respectivement, environ 1,5 et 2 fois plus volumineux que pour la condition ST). On peut donc établir que les souris nourries avec le régime BE possèdent plus de TA que les souris nourries avec CO ou SM, qui elles-mêmes en possèdent plus que les souris nourries au TO ou ST.

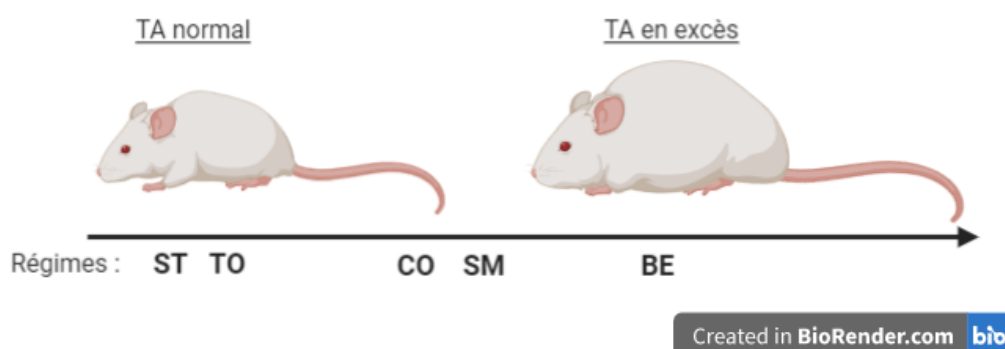


Figure 26. Répartition des régimes selon leur conséquence sur le volume du TA

Concernant les rapports de masse grasse sur masse totale (voir Figure S1 en Annexe 1), seules les souris nourries avec le régime BE et SM ont un rapport significativement plus élevé que les souris ST.

A la lumière de ces informations, nous pouvons maintenant aborder l'analyse de la taille et du nombre d'adipocytes sur nos coupes.

- Taille et nombre des adipocytes

Les différentes coupes de TA sous-cutanées réalisées selon de protocole en Annexe 2 ont pu être observées au microscope et comme nous pouvons le voir sur les coupes présentées ci-dessous, bien que la structure globale reste similaire, des variations sont notables concernant le nombre d'adipocytes présents sur la coupe ainsi que leur taille.

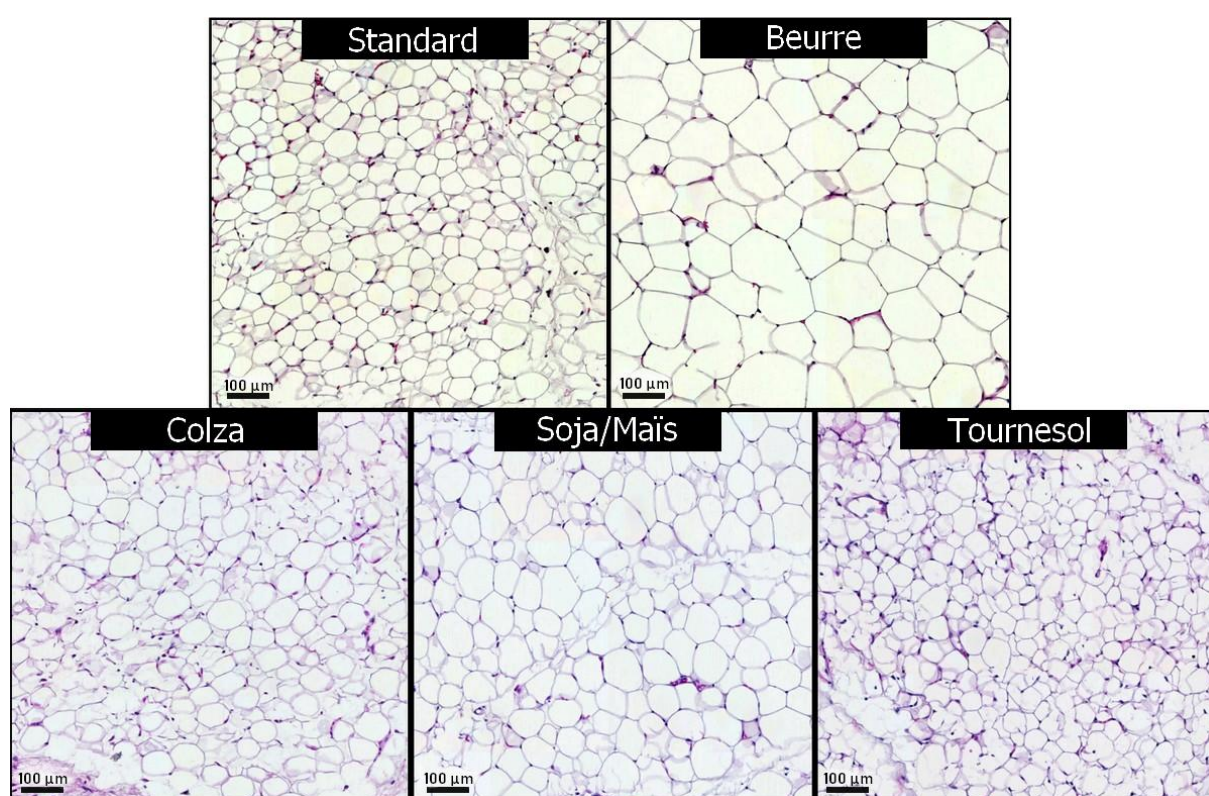


Figure 27. Observation du TA sous-cutané selon les différents régimes

A la suite du traitement des différentes images grâce à notre interface, nous avons pu obtenir pour chaque image le nombre d'adipocytes et la taille de chacun d'entre eux dans le fichier de résultat .xls qui accompagne chaque image de résultat. Pour traiter les données, nous avons, à l'aide d'un script python regroupé dans un unique fichier par condition le nombre d'adipocytes présents sur chaque coupe ainsi que leur taille moyenne. Ces résultats ont ensuite été saisis dans le logiciel GraphPad Prism et soumis à des analyses statistiques en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour une comparaison multiple. Les résultats sont présentés dans les figures ci-dessous :

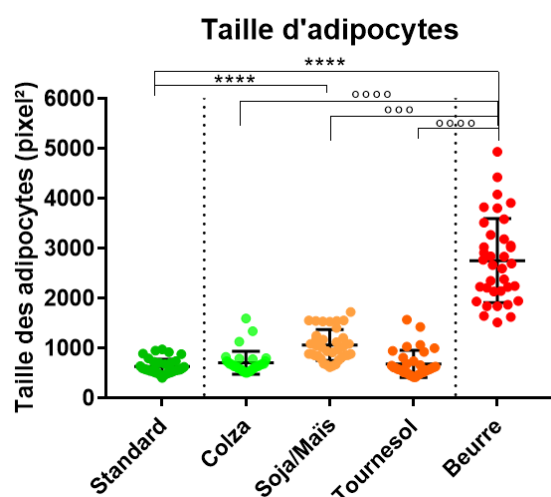


Figure 28. Taille des adipocytes en fonction des différents régimes.

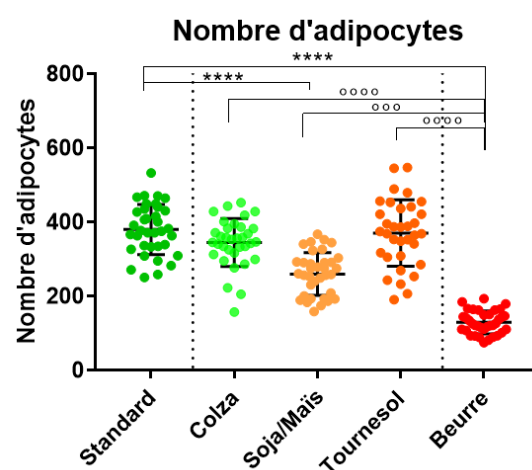


Figure 29. Nombre d'adipocytes en fonction des différents régimes.

Nous pouvons donc tout d'abord constater une différence significative entre ST et BE que ce soit en termes de taille ou de nombre. En effet, les coupes ST présentent beaucoup d'adipocytes de petite taille tandis que les coupes BE, en raison d'une surface plus importante en contiennent moins. Concernant les conditions tests (CO, SM et TO) seule SM est significativement différente de ST : les coupes SM présentent également moins d'adipocytes mais de taille plus importante. Cependant en comparaison au contrôle positif BE, les trois conditions tests ont significativement plus d'adipocytes qui sont de plus petites tailles. De plus, au sein des conditions tests, SM se distingue de manière significative de CO et TO par moins d'adipocytes et des adipocytes de plus grosse taille.

De plus, les indications sur les volumes des TA nous permettent d'établir que bien que moins d'adipocytes soient visibles sur les coupes BE et SM, s'expliquant par des adipocytes plus gros, cela ne signifie pas qu'il y en ait moins dans l'ensemble du TA. En effet, le TA des souris nourries au régime BE est le plus volumineux suivi de ceux de CO et SM. Ainsi, nous pouvons supposer que les TA BE et SM présentent autant si ce n'est plus d'adipocytes que les TA ST, CO et TO.

L'attente des chercheurs concernant cette expérience était plutôt d'obtenir des résultats progressifs, c'est à dire que TO aient des valeurs intermédiaires entre SM et BE comme il s'agit du régime test délétère. Or, il se trouve ici que TO ne présente pas de différence significative avec ST. Ces résultats sont, pour l'instant, à considérer avec précaution car les coupes ne proviennent que de quatre individus par conditions. La différence interindividuelle pourrait fausser les résultats sur un si petit échantillon. On constate en analysant les différentes coupes de TO une certaine hétérogénéité entre les individus. Afin d'obtenir une meilleure significativité, il faudrait augmenter ce nombre à dix ou douze souris.



La nature des lipides ne semble ici pas avoir un impact dépendant de la proportion. Le rapport  $\Omega 6 / \Omega 3$  ne serait donc pas un bon indicateur pour expliquer le nombre ou la taille des adipocytes d'un individu. Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, l'obésité n'est pas uniquement une pathologie en rapport avec le TA, elle implique également des réactions neuro-inflammatoires au niveau de l'hypothalamus. Donc bien que le rapport  $\Omega 6 / \Omega 3$  ne semble pas influencer de manière significative la composition et structure du TA, il se pourrait que l'action d'un surplus d' $\Omega 6$  soit plus impliqué dans les phénomènes d'inflammation au niveau du cerveau. Il a été montré par l'équipe que le régime TO semble induire une réactivité gliale, c'est à dire qui concerne les astrocytes et microglies, cellules immunitaires du cerveau et sources majoritaires de la production des médiateurs inflammatoires. Cette réactivité est associée à une neuro-inflammation dans l'hypothalamus, région qui pour rappel est majoritairement impliquée dans la régulation du comportement alimentaire.

## Déroulement du projet

- Démarche

- **Délimitation du sujet**

Après la répartition des projets au sein des étudiants de BIMB, nous avons effectué plusieurs séances à l'IPMC avec le Dr. Carole Rovère, chercheuse dans l'équipe GENE à l'IPMC, et le Dr. Frédéric Brau, responsable du service d'imagerie microscopique de l'IPMC/MICA.

Nous avons tout d'abord pris le temps de discuter de leurs demandes, d'échanger afin de bien cerner l'objectif de ce projet. Le Dr. Brau nous a créé un groupe et un compte individuel sur la base de données OMERO afin que nous ayons accès à certains datasets d'images pour pouvoir créer et faire fonctionner notre interface. Nous avons également téléchargé le logiciel Fiji. Le Dr. Frédéric Brau nous a fourni une macro ainsi que quelques scripts, qu'il avait lui-même codés, pour nous donner des points de repère et quelques bases sur lesquelles partir.

- **Choix du langage**

Plusieurs options étaient disponibles quant au choix du langage de programmation, en effet le logiciel Fiji permet d'exécuter des scripts en s'appuyant à la fois sur le langage Python et sur le langage Java. Afin de les mêler, deux langages utilisant à la fois les principes et règles de Python et de Java étaient envisageables. Il s'agit de Jython et Groovy. Le premier s'appuie majoritairement sur un script Python tout en utilisant la formulation et les bibliothèques Java. Concernant Groovy, la formulation est plus proche de Java que de Python. L'utilisation de l'un de ces deux langages est obligatoire pour pouvoir appeler l'environnement ImageJ et faire le lien avec Omero.

Ainsi nous avons tout d'abord commencé à coder en Jython, choix basé sur une plus grande ressemblance avec Python, notre langage de prédilection en informatique de par notre formation. Cependant, nous avons rapidement été limités pour coder certaines fonctionnalités essentielles à notre interface. De plus, un collaborateur de F. Brau, Julio Mateos Langerak, ingénieur de la plateforme "Montpellier RIO Imaging", nous a averti que Jython ne serait plus mis à jour, ainsi aucune nouvelle fonctionnalité ne sera développée via Jython pour l'utilisation d'ImageJ. Il nous a donc conseillé de nous orienter vers un script rédigé en Groovy.

De ce fait, nous nous sommes orientés et maintenus sur une utilisation du langage Groovy pour réaliser cette interface.

- **Démarche**

Lors de ce projet, nous avons essayé de suivre une logique de développement logiciel qui nous avait été présenté lors de ce semestre lors des enseignements de génie logiciel. En effet, nous avons été convaincus de son efficacité et de sa nécessité de part la nature du projet. Il semblait que celui-ci répondait à deux critères de sélection de ce type de développement : Les développeurs ne seront pas les utilisateurs et comme nous avons fait un outil modulable qui sera réutilisé, voire modifié, nous avons considéré que plusieurs équipes de développement travailleront dessus.

Bien que nous n'ayons pas réellement rédigé de documentation, nous pouvons affirmer avoir suivi un développement en V. Les réunions et discussions avant que nous ne commencions à coder avaient pour objectif de déterminer les besoins, les spécifications et la structure de notre outil. Ces étapes correspondent bien à la première phase de ce type de développement.

Une fois cette logique et les besoins établis, nous avons codé notre outil. C'est lors de cette phase de codage que nous avons commencé à estimer les erreurs auxquels nous pourrions être confrontés. C'est notamment à ce moment que les cas traités par les fenêtres d'erreurs ont été pensés.

Finalement, une fois les tests réalisés afin de vérifier le bon fonctionnement de notre outil, nous pensons vraiment pouvoir dire que nous avons suivi ce schéma de développement.

- **Développement d'un outil robuste**

Notre objectif premier était d'aider l'équipe du Dr. Rovère à automatiser et faciliter l'analyse de coupes de tissus pour utiliser la macro donnant le nombre et la taille des adipocytes des tissus. Toutefois, un des souhaits exprimés par le Dr. Brau était de pouvoir utiliser cet outil pour d'autres problématiques dans le contexte du déploiement de cette base de données pour l'ensemble des équipes en sciences de la vie d'UCA. Nous avons donc, grâce au choix de la macro laissé libre à l'utilisateur, permis de transposer cette interface à d'autres projets nécessitant l'utilisation d'une macro permettant également l'analyse des images présentes dans un dataset sur OMERO.

L'une des prochaines expériences mènera l'équipe à ré-utiliser notre interface pour analyser cette fois-ci des cellules gliales. Ils devront donc utiliser une nouvelle



macro qui pourra s'adapter à notre outil ou bien ils auront également la possibilité, grâce à notre description du code, de l'adapter à leurs nouveaux besoins.

- **Choix de la langue de l'interface**

Nous avons décidé de réaliser notre interface en langue anglaise afin que l'ensemble des chercheurs souhaitant l'utiliser puissent comprendre et remplir les bonnes informations. En effet, aujourd'hui le monde de la recherche est international et il nous a paru essentiel de créer un outil qui pourra être diffusé sur le site MICA et les échanges du code sur Github avec d'autres développeurs d'applications pour OMERO.

- **Limitations**

L'interface développée permet de répondre aux attentes du Dr. Rovère et remplit bien les différentes demandes fonctionnelles. Cependant, son utilisation peut présenter ce que certains considéreront comme un point faible, il s'agit du temps de traitement qui peut s'avérer long suivant le nombre d'images à analyser et du débit réseau. C'est un paramètre sur lequel nous n'avons aucune emprise, mais en effet, les étapes de chargement des images entre OMERO et ImageJ pour les analyser et les étapes d'importation des résultats sur OMERO requièrent un certain temps. Depuis nos postes en Wifi, il a fallu environ 1 minute pour traiter et analyser 1 image. L'utilisation de notre interface pour analyser un nombre  $n$  d'images sera tout de même plus rapide que le traitement manuel de ces  $n$  images. En effet, l'utilisateur doit rentrer dès le lancement de notre outil toutes les informations requises pour l'exécution de celui-ci, tandis que la démarche manuelle demandait plusieurs étapes de renseignement d'informations. De plus, nous pourrions penser que de ce fait, l'utilisateur pourrait, une fois notre outil lancé, utiliser leur poste de travail pour effectuer d'autres tâches. Cependant la macro utilisée génère plusieurs fenêtres lors de son exécution, il est donc très gênant de faire autre chose sur l'ordinateur pendant ce temps-là.

- **Améliorations**

Bien entendu, tout projet peut continuellement être amélioré et dans le temps qu'il nous a été donné pour travailler sur ce projet, nous avons en priorité répondu aux besoins de l'équipe. Cependant, nous avons réfléchi à certains points d'amélioration sur lesquels il serait intéressant de se pencher pour avoir une interface d'autant plus aboutie.

Nous avons travaillé de telle sorte à ce que notre interface puisse parfaitement interagir avec la macro utilisée par l'équipe. Pour la rendre encore plus robuste et permettre à plus de chercheurs de l'utiliser, il serait intéressant de la rendre plus adaptable pour la gestion des extensions des fichiers de résultats. A l'heure actuelle, notre outil n'accepte que deux types de sortie : 1) Résultat Image, 2) Résultat Image + Excel. Cependant, d'autres macros pourraient générer d'autres types de fichiers de sortie et ainsi avoir une extension différente de .tif ou .xls ou encore générer plus de deux fichiers de résultats.

Les deux derniers points qui pourraient être améliorés sont ici plus d'un ordre ergonomique. En effet, notre interface propose les différents ID de projets et de datasets sous forme de listes déroulantes mais ils ne sont pas organisés par ordre croissant. Par souci de facilité, un affichage de ces ID dans l'ordre croissant pourrait être appréciable, d'autant plus si de nombreux datasets sont présents dans un projet. Le dernier point concerne l'affichage d'une barre de progression lors de l'exécution de la macro sur les différentes images, ce qui permettrait à l'utilisateur de pouvoir suivre le déroulement de l'analyse en temps réel, bien que des informations textuelles soient déjà fournies.

Ainsi, les différents points abordés ci-dessus peuvent être des pistes de travail pour des personnes souhaitant améliorer notre outil mais ils ne sont en aucun cas indispensable au bon fonctionnement de notre interface dans le cadre de ce projet.

## Conclusion

Ce fut un projet extrêmement enrichissant sur plusieurs aspects. La collaboration avec des chercheurs de l'IPMC nous a beaucoup appris et nous a permis de travailler en conditions réelles. Nous avons ainsi pu appréhender au mieux les besoins de biologistes et la communication afin de relier l'informatique à la biologie. Nous avons dû adapter notre vision du projet aux outils à notre disposition. En effet, les logiciels utilisés en laboratoire ne possèdent pas obligatoirement les mêmes versions de langages de programmation que celles que nous utilisons en cours. De plus, le but principal de ce projet est de simplifier le travail des chercheurs, nous nous devons donc de rendre notre interface ergonomique et facile dans sa prise en main. Les instructions laissées dans ce rapport permettront également d'en expliquer le fonctionnement exact afin que cet outil puisse être utilisable ou améliorable par un tiers.

Nous pensons que notre interface sera d'une grande utilité d'une part à l'équipe, pour analyser les coupes de TA et des coupes de cellules gliales. D'autre part, étant donné la versatilité de l'outil qui peut appeler des macros génériques, il pourra être utile à la communauté des utilisateurs d'Omero en le diffusant sur Github. Ce projet, bien qu'assez conséquent fut un travail valorisant menant à une réelle satisfaction. En effet, cet outil sera utilisé par l'équipe du Dr. Rovère ainsi que par d'autres équipes si les macros utilisées parviennent à être adaptées à notre interface.

Nous tenons à remercier le Dr. Rovère ainsi que le Dr. Brau de nous avoir fait confiance pour réaliser ce projet et de nous avoir accompagnés tout au long de sa réalisation. Leurs explications et conseils ont été précieux et nous ont permis de mieux orienter notre travail.

## **Bibliographie**

Angrisani, L., Santonicola, A., Iovino, P., Formisano, G., Buchwald, H., and Scopinaro, N. (2015). Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes. Surg.* 25, 1822–1832.

Burel, J.-M., Besson, S., Blackburn, C., Carroll, M., Ferguson, R.K., Flynn, H., Gillen, K., Leigh, R., Li, S., Lindner, D., et al. (2015). Publishing and sharing multi-dimensional image data with OMERO. *Mamm. Genome* 26, 441–447.

Hruby, A., Manson, J.E., Qi, L., Malik, V.S., Rimm, E.B., Sun, Q., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2016). Determinants and Consequences of Obesity. *Am. J. Public Health* 106, 1656–1662.

Katharina Stobbe (2019). THE CHEMOKINE CCL5, A KEY REGULATOR OF NEUROINFLAMMATION AND TYPE 2 DIABETES ASSOCIATED WITH DIET-INDUCED OBESITY. Côte d'Azur.

Kelly, T., Yang, W., Chen, C.-S., Reynolds, K., and He, J. (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int. J. Obes.* 32, 1431–1437.

Kotz, C.M., Perez-Leighton, C.E., Teske, J.A., and Billington, C.J. (2017). Spontaneous Physical Activity Defends Against Obesity. *Curr. Obes. Rep.* 6, 362–370.

Levinge, E., Stapleton, P., and Sabot, D. (2020). Delineating the psychological and behavioural factors of successful weight loss maintenance. *Heliyon* 6, e03100.

Meldrum, D.R., Morris, M.A., and Gambone, J.C. (2017). Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will? *Fertil. Steril.* 107, 833–839.

Patni, N., Quittner, C., and Garg, A. (2018). Orlistat Therapy for Children With Type 1 Hyperlipoproteinemia: A Randomized Clinical Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103, 2403–2407.

Plourde, B., Sarrazin, J.-F., Nault, I., and Poirier, P. (2014). Sudden cardiac death and obesity. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 12, 1099–1110.

Prospective Studies Collaboration (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *The Lancet* 373, 1083–1096.

Rahman, M., and Berenson, A.B. (2010). Accuracy of Current Body Mass Index Obesity Classification for White, Black, and Hispanic Reproductive-Age Women: *Obstet. Gynecol.* 115, 982–988.

Rexrode, K.M. (1997). A Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Stroke in Women. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 277, 1539.

Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56, 365–379.

Vincent SIMON (2019). Characterization of different subpopulations of hypothalamic POMC neurons in the regulation of energy balance. Bordeaux.

Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., and Luo, Y. (2012). RNAscope. *J. Mol. Diagn.* 14, 22–29.

## Sitographie

- [1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=bioinformatics>
- [2] <https://cytomine.coop/>
- [3] <https://ecotaxa.obs-vlfr.fr/>
- [4] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- [5] <https://www.imc.fr/calcul>
- [6] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- [7] <https://wikplus.blogspot.com/2019/03/obesity-and-overweight.html>
- [8] Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* **9(7)**: 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019 (on Google Scholar).
- [9] <http://unice.fr/plateformes/mica/page.html>
- [10] <https://docs.openmicroscopy.org/ome-model/6.0.1/ome-tiff/#>
- [11] <http://unice.fr/plateformes/mica/contenus-riches/documents-telechargeables/dossier-de-stockage/MutiMage27juinCANCER.pdf>
- [12] <https://imagej.net/ij/docs/guide/146-29.html#sub:Subtract-Background%E2%80%A6>
- [13] <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-29.html>
- [14] <https://github.com/ome/omero-insight/releases/tag/v5.5.1>

## Annexes

- Annexe 1 : Tomographie

- Protocole d'analyse de tomographie microscopique**

La quantification du TA des souris anesthésiées a été effectuée à l'aide d'une analyse par tomographie microscopique à rayons X SkyScan-1178 et a été réalisée comme décrit précédemment (Beranger et al., 2014) : 104µm de la taille d'un voxel, 49 kV, filtre en aluminium de 0,5mm d'épaisseur, pas de rotation de 0,9°. Le volume du TA total a été déterminé entre la vertèbre cervicale 1 (C1) et la vertèbre thoracique 13 (T13), tandis que la zone du TA intra-abdominale et sous-cutanée a été mesurée sur une section au niveau 5 (L5) lombaire. La surface et le volume du TA ont été analysés à l'aide des logiciels NRecon et CTAn (Bruker microCT, Kontich, Belgique).

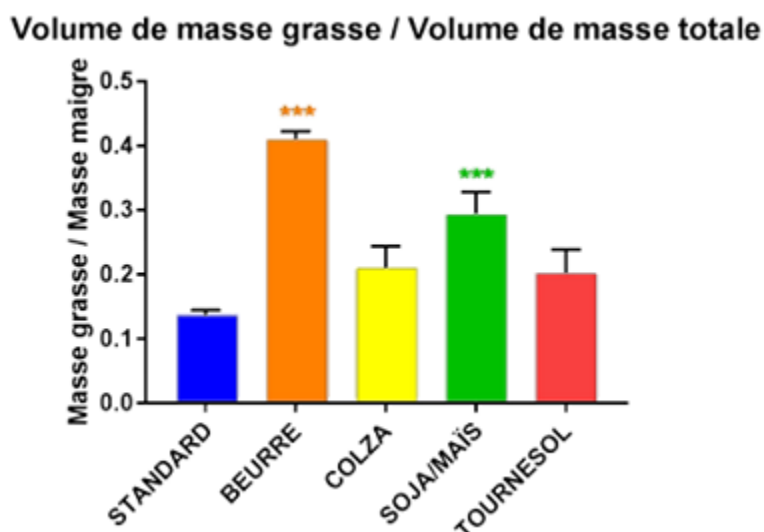


Figure S1. Rapport masse grasse/masse totale calculé en fonction des différents régimes

- Annexe 2 : Histologie du tissu adipeux

- Protocole d'analyse des adipocytes**

Les tissus ont été recueillis, fixés pendant 24 heures dans du paraformaldéhyde à 4%, enrobés de paraffine, découpés en sections de 5µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome RM 2255 (Leica) et séchés pendant la nuit à 37°C. Toutes les sections ont ensuite été déparaffinées dans du xylène, réhydratées par de l'alcool et lavées dans une solution saline tamponnée au phosphate. Les coupes colorées à l'hématoxyline-éosine ont été imagées avec le scanner de diapositives Vectra Polaris à l'aide d'un objectif 20X NA 0.45 et visualisées avec le logiciel Phenochart. L'analyse automatisée de la surface des adipocytes a été effectuée à l'aide de l'interface que nous avons développée dans le cadre de ce projet.