



# CAHIER DES CHARGES

**Programme de comptage de cellules  
par intelligence artificielle**

Rédigé par

**RAPHAELLE PAOUNOV**

18.03.2023

# Logiciel de comptage cellulaire automatisé

## Introduction

Epilab cherche à diversifier ses activités en dehors du développement de dispositifs de tests de dépistage pour la tuberculose. Pour ce faire, l'équipe R&D travaille sur le développement de tests de concentration de cellules cancéreuses pour les professionnels de laboratoire. Le principe du test se base sur la capture de cellules à l'aide de billes magnétiques, et la concentration de ces dernières. La figure 1 représente les étapes suivies lors d'un protocole classique de capture cellulaire. Elle permet de comprendre à quoi correspond un échantillon préparé pour la microscopie.

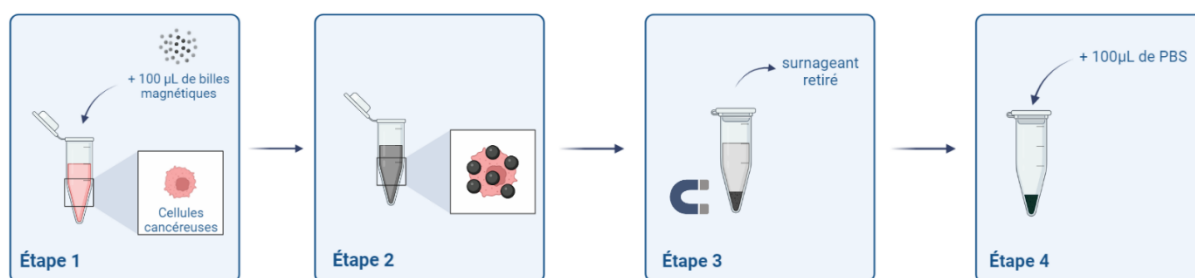


Figure 1. Schéma expérimental d'un protocole de capture de cellules eucaryotes par des billes microbilles magnétiques.

A l'étape 1, une suspension de cellules cancéreuses est préparée à une concentration donnée en milieu aqueux (ex : solution de Phosphate Buffered Saline 1X = PBS 1X). Mais elle peut aussi être dans d'autres milieux comme : du crachat plus ou moins visqueux, du milieu de culture etc... A l'étape 2, des billes magnétiques sont ajoutées, celles-ci réagissent avec les cellules en se fixant ou non sur leur surface. Le surnageant (liquide contenant tout sauf les billes) obtenu à l'étape 3 est centrifugé pour être concentré. Ainsi il peut être observé au microscope. Le culot de billes magnétiques ayant capturées ou non des cellules, obtenu à l'étape 4, est lui aussi observé au microscope à la même concentration que le surnageant. Lors de cette observation, le nombre de cellules de l'échantillon est déterminé par la technique de comptage sur cellules de Malassez (Annexe 1).

Les surnageants et culots vont toujours de paires pour pouvoir calculer ce que l'on appelle le « ratio de capture » qui correspond au pourcentage de cellules capturées par les billes magnétiques. L'aspect des culots et des surnageants sont très différents car les culots contiennent des billes magnétiques et les surnageants non. Les culots sont donc visuellement plus sombres et parsemés de billes noires/brunes alors que les surnageants sont clairs et les cellules sont « nues » (non recouvertes de billes). Il est possible d'observer des cellules non recouvertes de billes dans les culots, soit des cellules nues au milieu des billes. Des photos sont données en annexes 2,3,4 et 5 illustrant les différentes situations. En annexe 6, un schéma de microscope optique pour aider à la compréhension du vocabulaire utilisé.

## Solution utilisée actuellement

Le comptage en cellules de Malassez s'effectue à l'aide d'une lame de Malassez avec fond en métal. L'échantillon est injecté par capillarité entre la lame et la lamelle (Voir Annexe 1) puis est placé dans un microscope optique ([Lien du microscope pour avoir ses caractéristiques techniques : https://amscope.com/products/b120c-e1?variant=40347604058287](https://amscope.com/products/b120c-e1?variant=40347604058287)). Un adaptateur pour smartphone est placé sur un des oculaires pour prendre des photos des échantillons. Le téléphone qui sera utilisé à l'avenir pour la prise de photos sera un iPhone 8.

Plusieurs outils peuvent être utilisés pour améliorer l'aspect visuel de l'échantillon : la coloration cellulaire ou les filtres pour microscope (darkfield, filtre de couleur, etc ...).

## Problématique

Le comptage sur cellules de Malassez est effectué sur plusieurs échantillons (jusqu'à 70 parfois), rendant le processus très long et fatigant car l'observateur doit analyser les cellules directement à l'oculaire du microscope. Ce dernier émettant une lumière forte et claire entraîne la fatigue des yeux au cours du temps de manipulation. Alors un certain nombre de rectangles est compté et non toute la plaque.

La technique utilisée est contraignante et fastidieuse. Elle requiert un téléphone portable ayant une caméra adaptée et une très bonne résolution d'image. Plusieurs personnes sont amenées à manipuler en laboratoire et donc chaque personne utilise un téléphone différent avec des paramètres différents, altérant la standardisation des images prises.

La matrice de l'échantillon a un impact sur la visibilité des cellules. Une matrice très concentrée en billes magnétiques masque les cellules. Un crachat affecte aussi la lecture, car il est composé de plusieurs types cellulaires qui ne sont pas comptés lors de l'analyse.

## Besoins & attentes du rendu

Le développement d'un programme d'intelligence artificielle pour le comptage de cellules avec billes magnétiques est donc nécessaire. Il est attendu de ce programme des objectifs primaires et des objectifs secondaires qui pourront être traités que si les objectifs primaires sont atteints :

Objectifs primaires :

- Compter des cellules avec une fiabilité de 95% minimum (5% d'erreur) par image
- Pouvoir analyser tout type d'image (avec ou sans billes, matrice complexe ou non)
- Facile d'utilisation (interface utilisateur ou un protocole d'utilisation clair et précis)
- Modifiable ultérieurement (partage du code)

Objectifs secondaires (organisés par ordre de priorité, haut vers bas) :

- Calcul de l'écart type du résultat (les échantillons sont toujours faits en triplicat, il est donc possible de déterminer l'écart type sur un triplicat)
- Calcul d'un ratio de capture : nombre de cellules capturées (comparaison culot et surnageant)
- Calcul du recouvrement des cellules par les billes magnétiques
- Résultats des calculs sous forme csv pour être analysés sur Microsoft Excel
- Pré-analyse des résultats, ex : « la condition en PBS a plus capturé que celle en crachat »

## Moyens déployés pour le développement

Afin de permettre la réalisation de la demande, Epilab mets a disposition les outils et données suivantes :

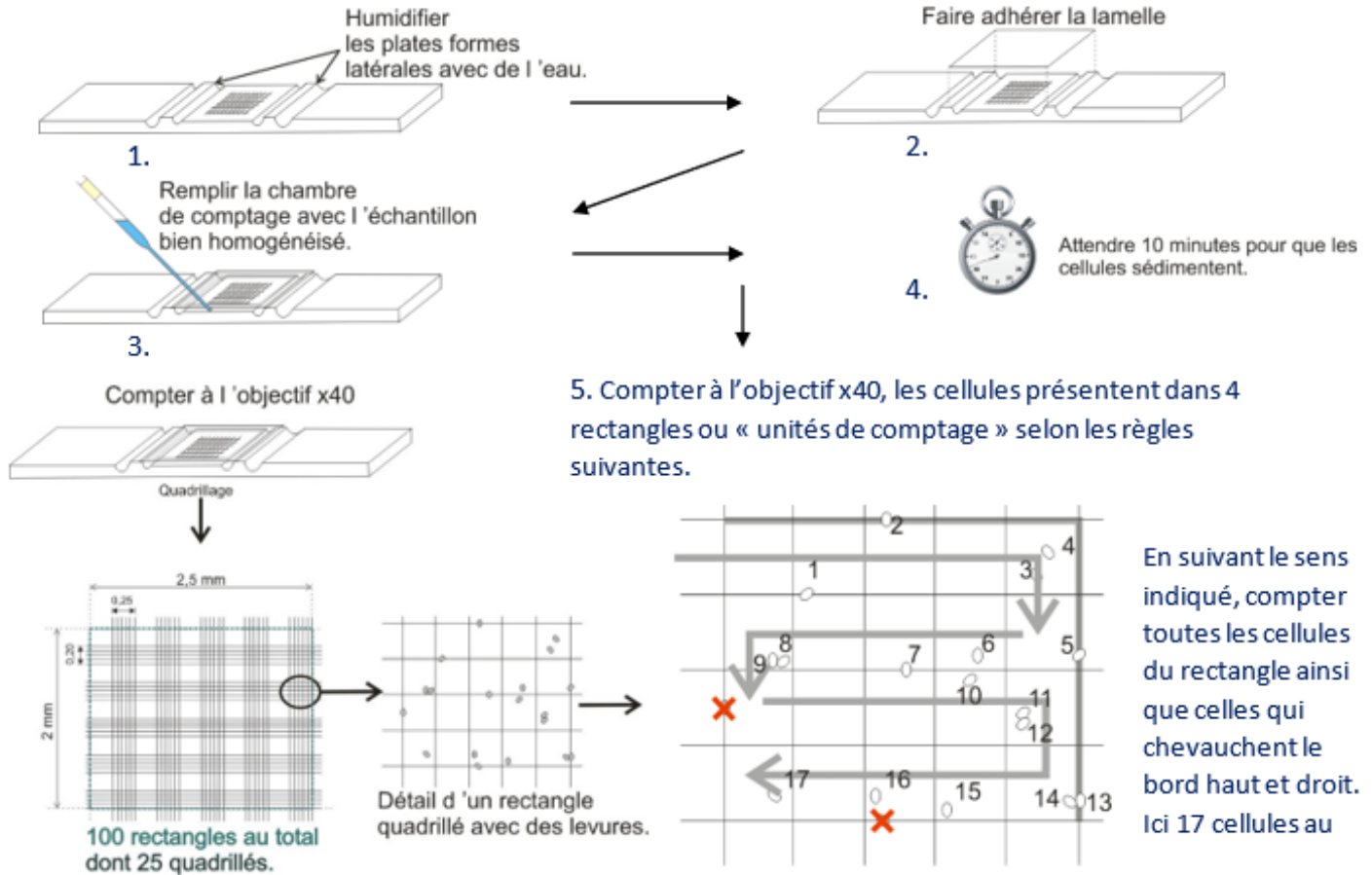
- Accès à un dossier Dropbox pour le stockage et l'échange de fichiers liés au développement du programme (photos, code, etc ...)
- Abonnement mensuel aux services Google Colab permettant l'accès à des ressources informatiques performantes pour le développement d'IA
- Partage de photos pour l'entraînement de l'IA
- Accès au canal Slack pour faciliter la communication
- Rendez-vous hebdomadaires pour suivre l'avancée du projet

**Fiche technique**

**TECHNIQUE DE DENOMBREMENT  
L'HEMATIMETRE DE MALASSEZ : NUMERATION DIRECTE**

Un hématimètre est une lame spéciale, quadrillée, qui permet de dénombrer dans un volume précis et connu, tous les éléments visibles à l'objectif 40 du microscope.

**Mode opératoire**



Sur Malassez un rectangle ou unité de comptage contient  $0,01 \text{ mm}^3$  c'est-à-dire  $0,01 \mu\text{L}$  d'échantillon (rappel  $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mL} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ L}$ ).

**Calculs**

Formule à appliquer :

Nombre de cellules par unité de volume

Nombre de cellules comptées

Facteur de dilution

Nombre d'unités de comptage dénombrées

Volume d'une unité de comptage

$$N = \frac{n}{a.v} \times Fd$$

nombre de cellules par unité de volume

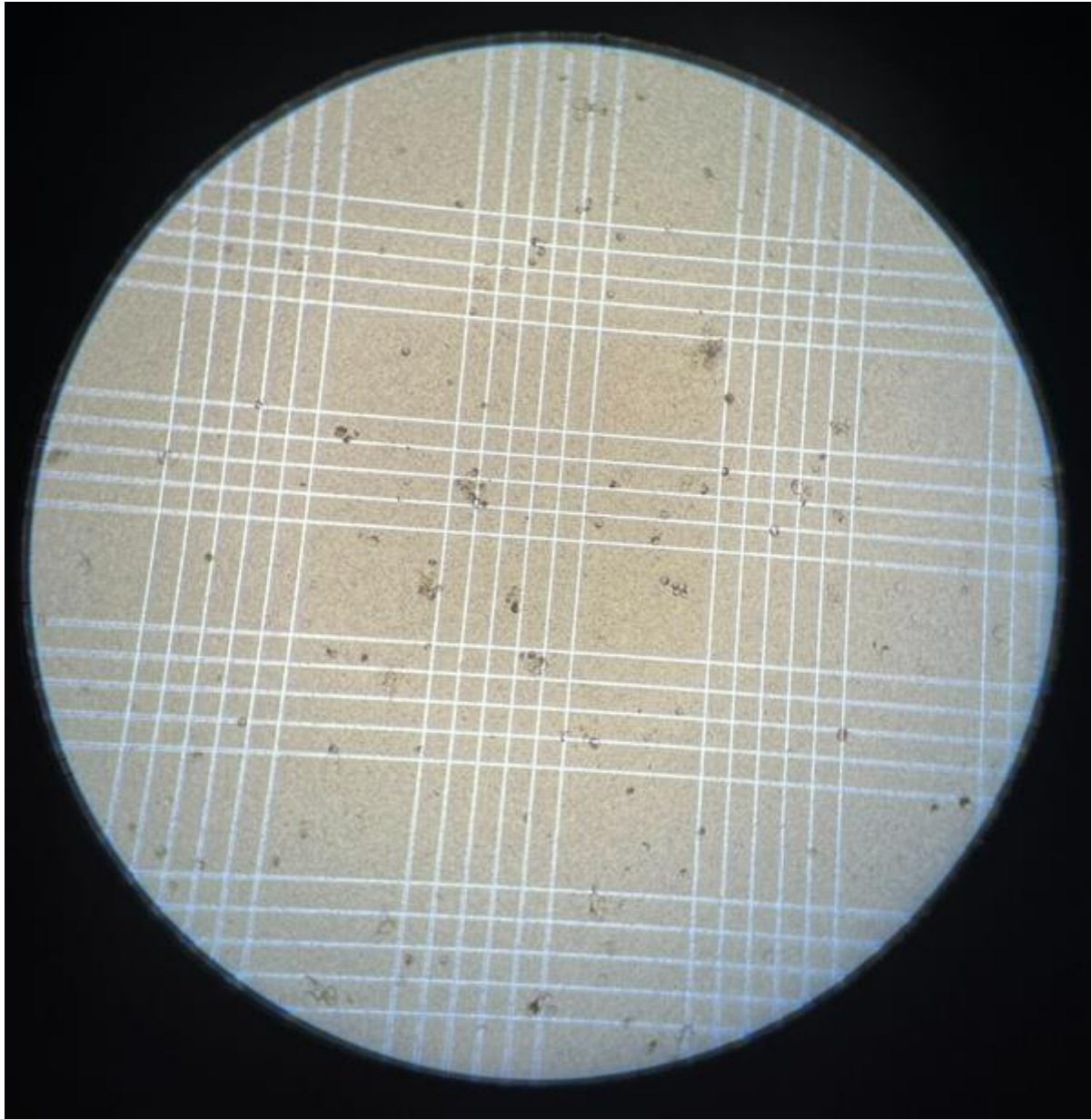
Soit une suspension de levures diluée 1000 fois et dénombrée en cellule de Malassez. Le dénombrement de 4 rectangles donne les résultats suivant 17, 22, 15, et 20 cellules pour chaque unité de comptage (rectangle).

Le volume d'une sous unité est  $0,01 \text{ mm}^3$ , si on veut le résultat en cellules/mL il faudra convertir le volume de l'unité de comptage en mL soit  $0,01 \cdot 10^{-3} \text{ mL}$ .

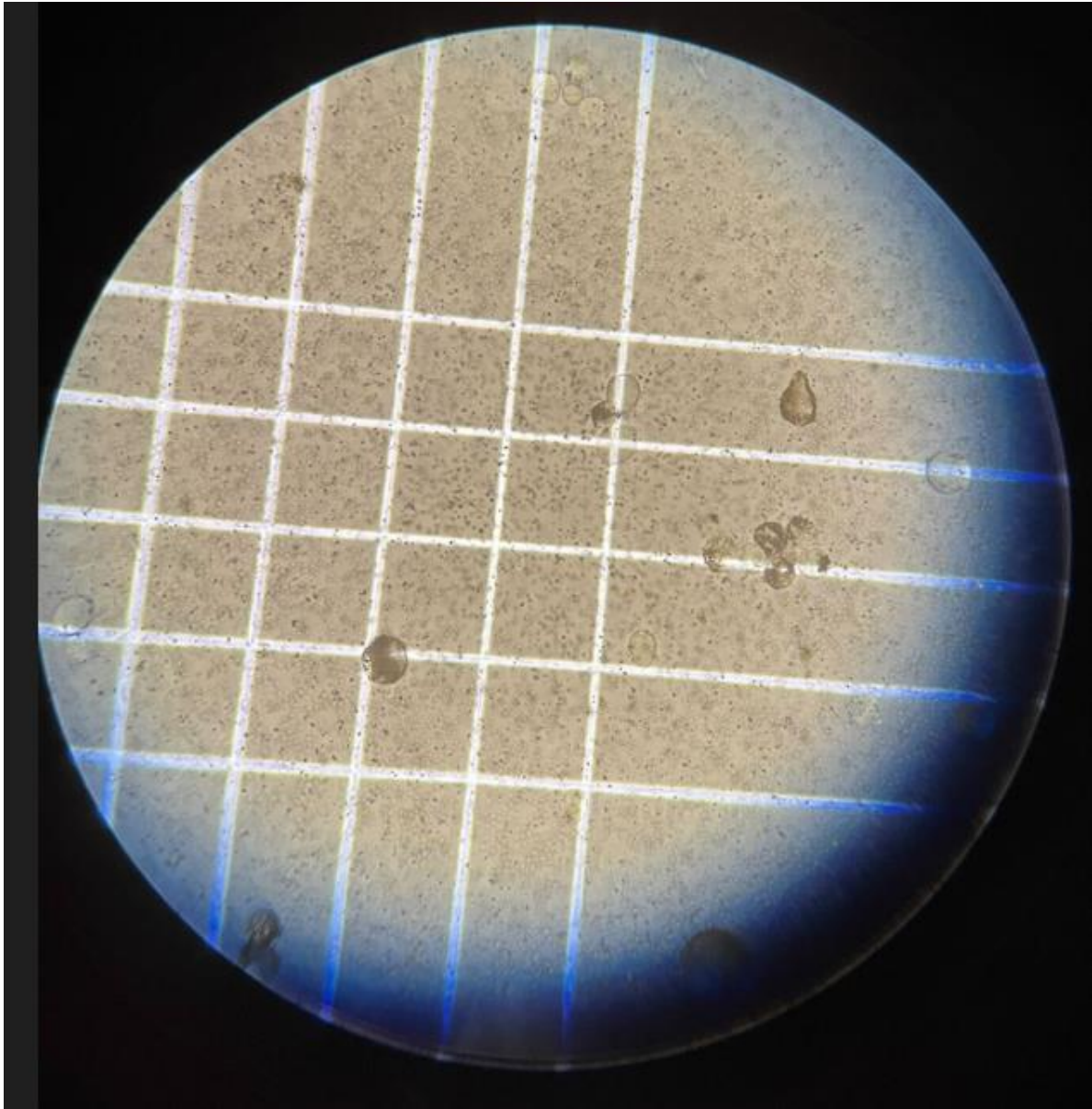
$$\text{Concentration} = \frac{N}{a.v} \times Fd = \frac{(17 + 22 + 15 + 20)}{4 \times 0,01 \cdot 10^{-3}} \times 1000 = \frac{74}{4 \times 0,01 \cdot 10^{-3}} \times 1000 = 1,89 \cdot 10^9 \text{ cellules / mL}$$



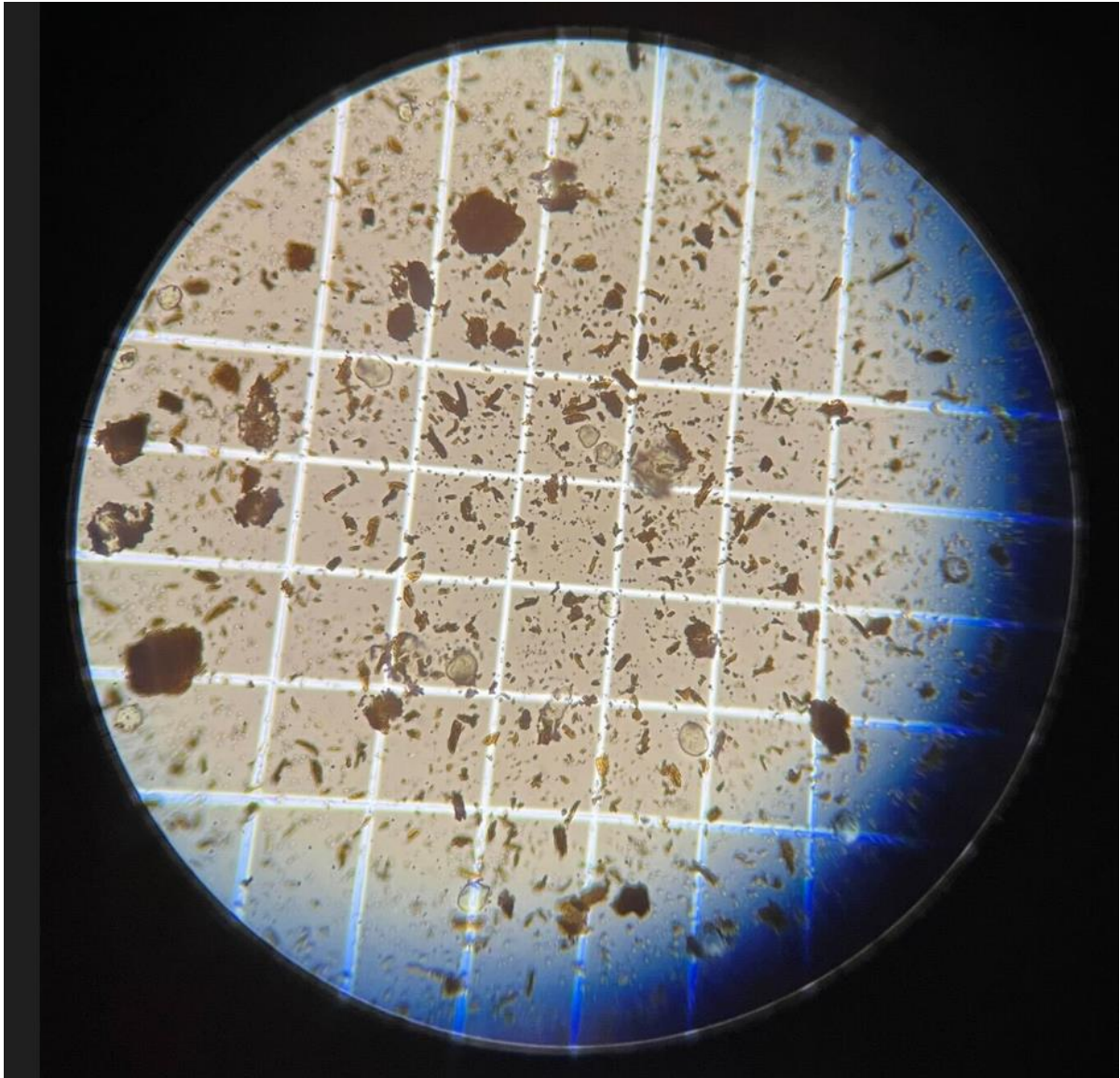
*Annexes 2. Photo d'un échantillon de culot de cellules cancéreuses avec des billes magnétiques de 300nm de diamètre. Grossissement x100.*



*Annexes 3. Photo d'un échantillon de culot de cellules cancéreuses avec des billes magnétiques de 300nm de diamètre. Grossissement x400.*

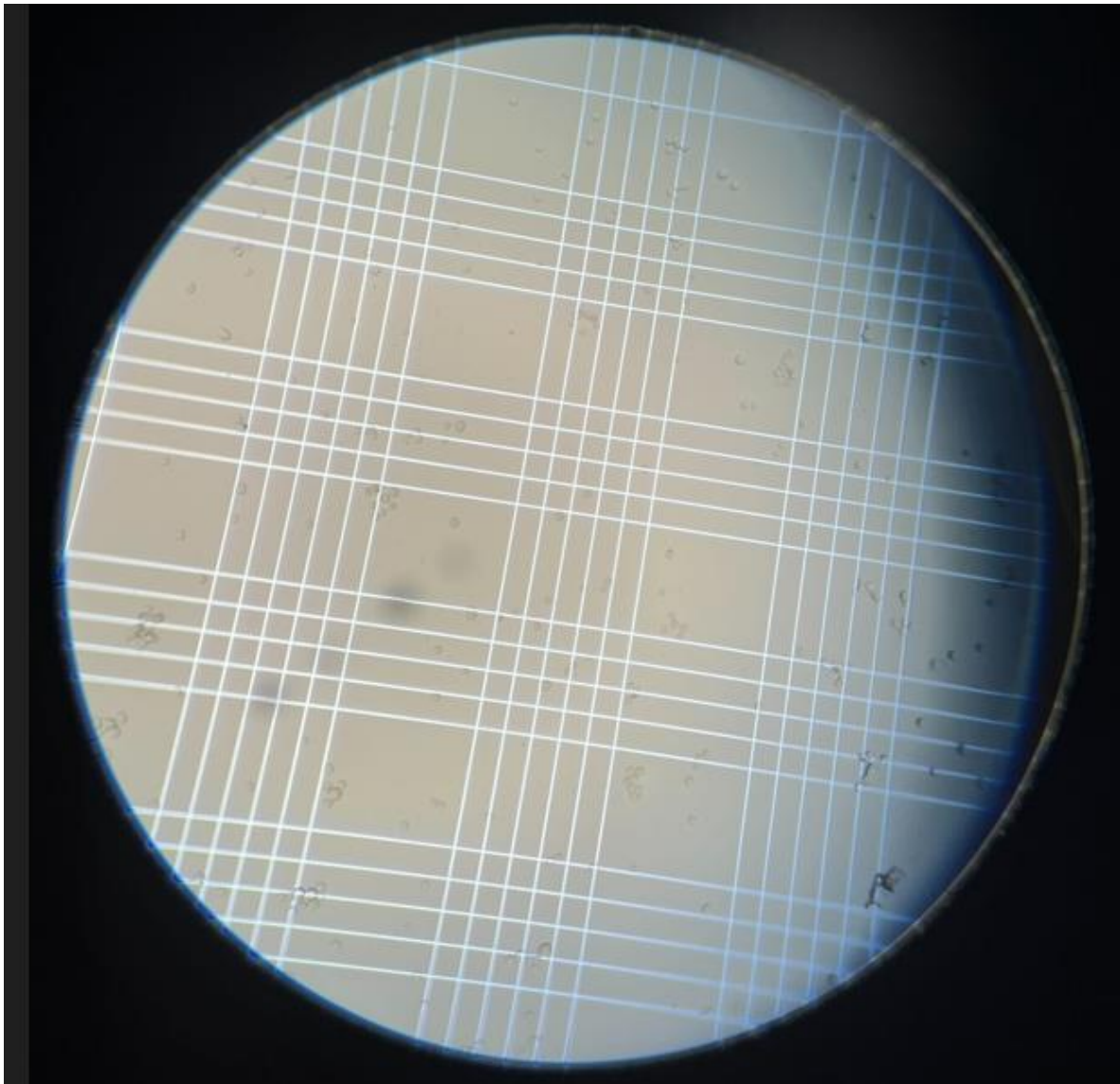


Annexes 4. Photo d'un échantillon de culot de cellules cancéreuses avec des billes magnétiques de  $1\mu\text{m}$  de diamètre. Grossissement  $\times 400$ .





*Annexes 5. Photo d'un échantillon de surnageant de cellules cancéreuses. Grossissement x100.*



*Annexes 6. Schéma légendé d'un microscope optique avec binoculaire.*

