

MICROPICELL

DOCUMENTATION

Soft Count Nucleus

MicroPICell SFR Santé F. Bonamy
INSERM CNRS Univ. Nantes UMS3556

Réalisé par :

NAULLET Guillaume ,Dr
PAUL-GILLOTEAUX Perrine
&

Co-encadrants :

BLANDIN Stéphanie
(MicroPICELL),
CHARPENTIER Eric (BIRD)
Configuration du serveur et de
la VM :
GUILLAUME Jean-Francois
(BIRD),



Table des matières

1	Un soft permettant un workflow de quantification	3
1.1	Vision global du soft	3
1.2	Accès au logiciel et aux données	4
1.3	Premier Onglet : Segmentation d'une image	4
1.4	Ameliorer votre segmentation	6
1.5	Appliquer ce classifieur	7
1.5.1	Classification d'une image entière	7
1.5.2	Classification de(s) ROI(s) de l'image	7
1.6	Panel count	8
1.7	Onglet Batch	13
2	Informations Developpement informatique	16
2.1	API utilisée	16
2.1.1	Openslide	16
2.1.2	Weka	16
2.1.3	ImageJ	16
2.2	Configuration matérielle	16

1 Un soft permettant un workflow de quantification

1.1 Vision global du soft

Le logiciel a pour objectif de quantifier les lames au format ndpi, obtenu sur le scanner de lame Hammatsu de la plateforme Micropicell. Afin de bien comprendre le fonctionnement de ce logiciel, il est montré ci-dessous une capture d'écran présentant ses différentes composantes.

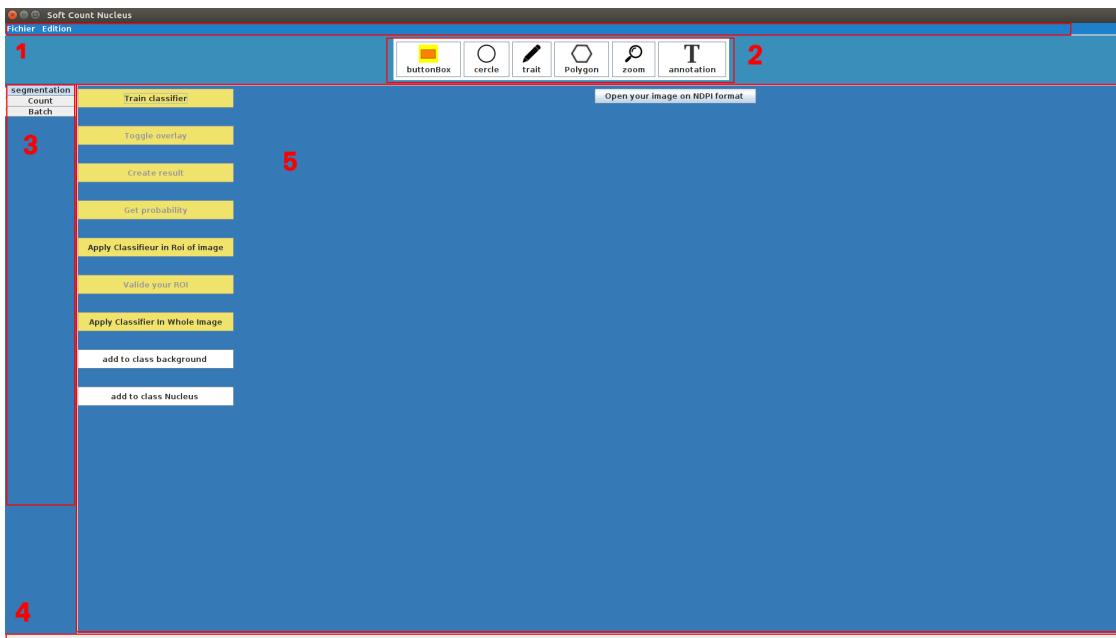


FIGURE 1: Aspect global du logiciel réalisé. Les différentes zones sont décrites ci-dessous.

Il est possible de voir l'interface à l'ouverture de ce logiciel. La partie 1 permet l'ouverture des images et la sauvegarde de la session de travail. La partie 2 de l'interface permet d'effectuer des commandes de base permettant d'interagir avec l'image. La partie 3 est la partie comportant la navigation entre les différents onglets qui sont au nombre de 4 (ouverture des images & segmentation, comptage,

batch processing et visualisation des ROI segmentée). La quatrième permet de connaître des informations sur l'image à la position de la souris (position de la souris sur l'image, intensité du pixel RGB). La 5ème et dernière partie permet quant à elle l'affichage des images et des commandes permettant les différentes étapes du comptage de noyaux.

1.2 Accès au logiciel et aux données

Le logiciel est déployé sur le serveur de calcul de Bird. Il est accessible via une machine virtuelle, sur réservation (gratuite) en tapant dans son navigateur <http://172.18.253.81/>. Si ce lien n'est pas accessible, il faut rajouter une exception proxy pour cette adresse dans votre navigateur (configuration manuelle du Proxy cache.ha.univ-nantes.fr, port 3128, Pas de Proxy pour 172.18.253.81) Les données doivent être placées (tester les raccourcis) sur le serveur Micropicell, dans le répertoire H :Galaxy (tester si lien symbolique ok). Depuis l'application, elle seront accessible sous /sandbox/micropicell/images

1.3 Premier Onglet : Segmentation d'une image

Après avoir ouvert une image, il faut faire ce que l'on appelle l'entraînement du classifieur, c'est à dire apprendre à l'ordinateur quels pixels correspondent à vos noyaux et quels pixels correspondent à votre background. Cet "entraînement" se fait sur une petite zone de l'image.

Pour réaliser cette action, il suffit de zoomer sur une zone d'image permettant de dissocier visuellement les noyaux de votre fond. Pour cela il suffit de cliquer sur l'icône "zoom" et de faire un clique gauche pour zoomer et clique droit pour dézoomer.

Il est visible sur la figure ci-dessus qu'il suffit de tracer à la souris les zones d'intérêt qui seront des exemples pour le classifieur. Commencer par cliquer sur l'icône "trait" et dessiner plusieurs noyaux (un trait au centre du noyaux suffit), ensuite il suffit de cliquer sur le bouton "add to class nucleus", il suffit ensuite de répéter cette étape pour le background.

Une fois cette étape terminée, il suffit de cliquer sur "train classifier", le classifieur segmente votre ROI et stock le classifieur. L'image segmenté est visible en cliquant sur le bouton overlay, si le classifieur n'est pas à votre convenance vous pouvez le modifier en rajoutant des traits aux deux classes. Il est aussi possible de voir la carte des probabilité en cliquant sur "get probability".



FIGURE 2: Onglet segmentation.

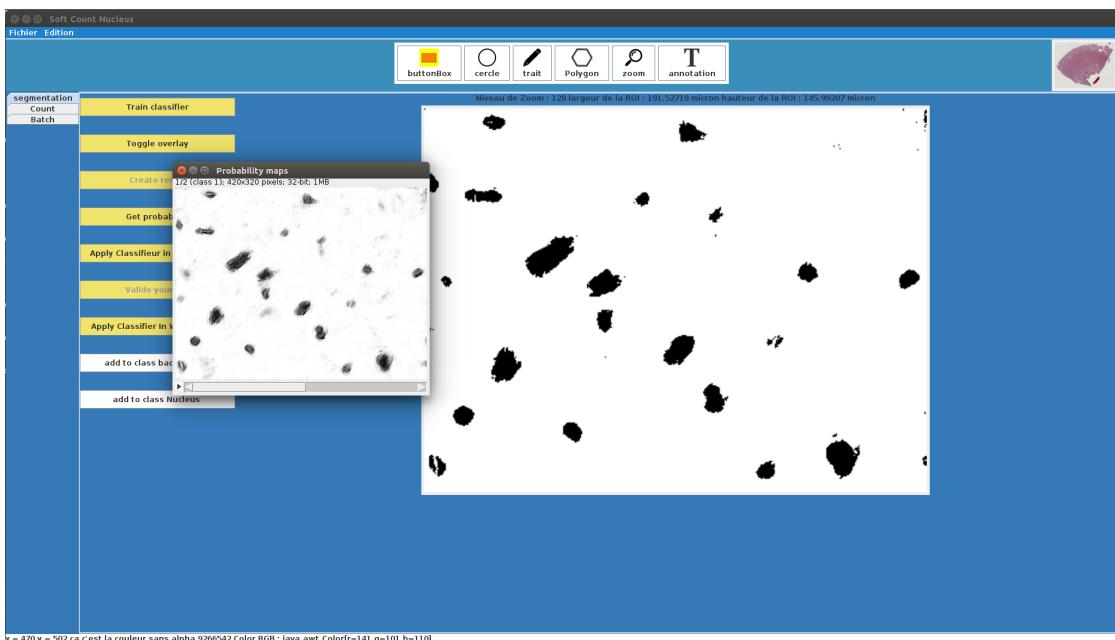


FIGURE 3: Visualisation de l'overlay et de la carte de probabilité.

1.4 Améliorer votre segmentation

Il est possible d'améliorer votre segmentation en ajoutant une étape de déconvolution couleur. Pour ce faire il vous suffit de cliquer sur le bouton "Color deconvolution", cette action va permettre d'ouverture la fenêtre visible ci dessous, le paramètre par défaut est la séparation par RGB, mais cette option peut être modifié dans l'onglet supérieur "parameter"/"Deconvolution Parameter".

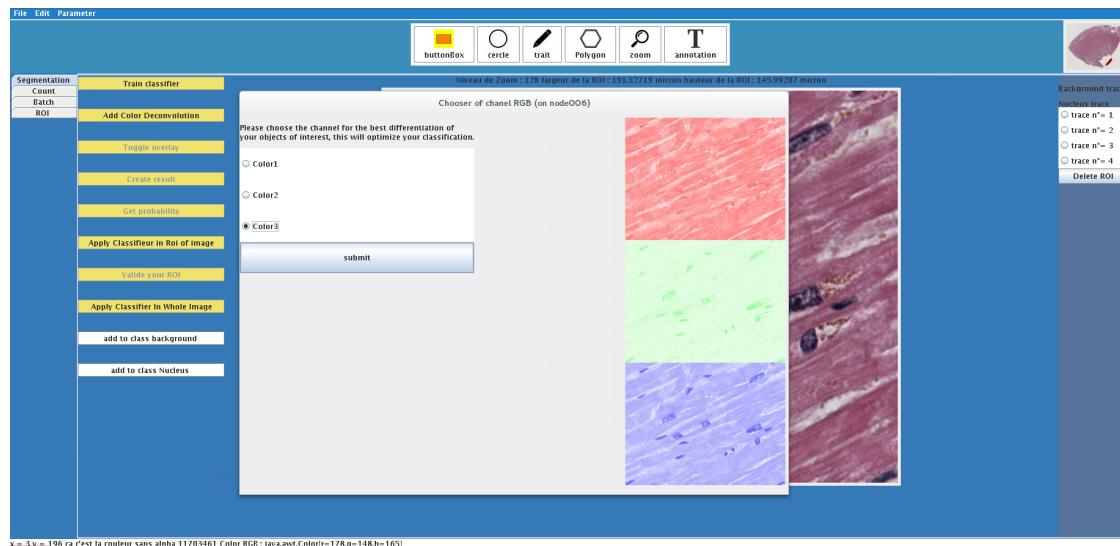


FIGURE 4: Choix de votre déconvolution.

1.5 Appliquer ce classifieur

Une fois cette étapes terminé, 2 choix s'offrent à vous la première est la segmentation de votre image entière et la deuxième est une sélection de vos ROI.

1.5.1 Classification d'une image entière

Cette étape demande peu de travail simplement de presser le bouton "apply classifier in whole image". Cette étape est par contre très longue à être réalisé du fait de la taille des images. C'est pour cela qu'une adresse mail va vous être demandé afin de vous prévenir lorsque cette segmentation sera terminé. Il vous suffira ensuite de vous reconnecter quand cette segmentation sera terminée.

1.5.2 Classification de(s) ROI(s) de l'image

Pour réaliser une segmentation sur vos ROIs, il suffit de presser le bouton "Apply classifier in ROI of image" active un tracé de polygon qui vous permettra ainsi de sélectionner vos zones d'intérêt. Une fois l'ensemble des ROIs sélectionné, il est possible de lancé la segmentation en cliquant sur le bouton "validation".



FIGURE 5: Aspect global du logiciel réalisé. Les différentes zones sont décrites ci dessous.

1.6 Panel count

Cet onglet contient 5 boutons, le slider permettant de naviguer entre vos différentes ROIs, si vous en aviez sélectionné précédemment.

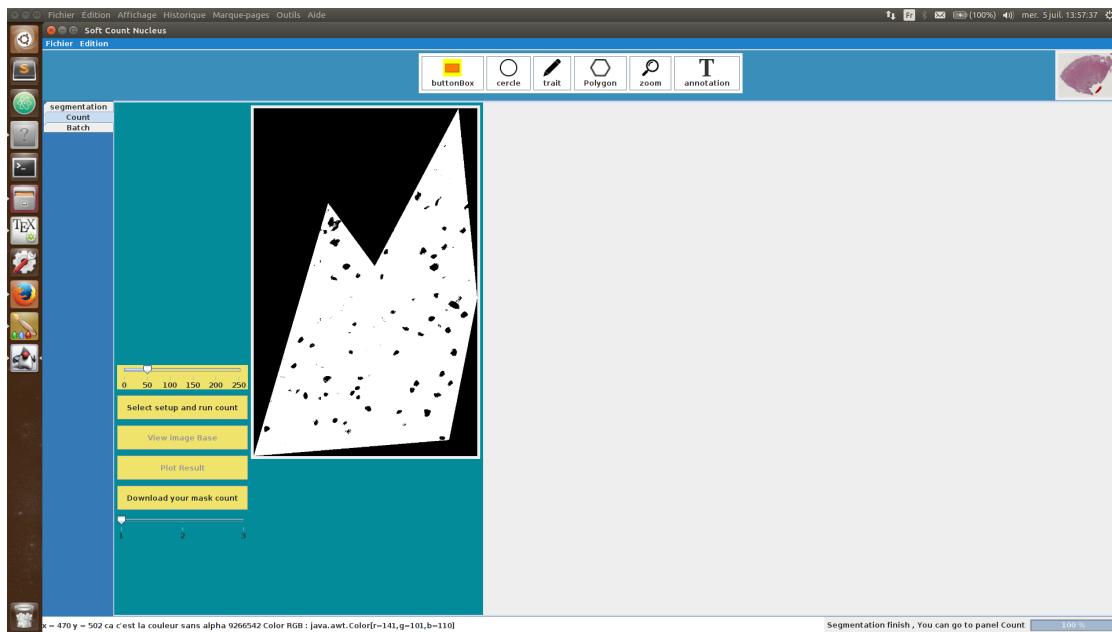


FIGURE 6: Aperçue du panel Count

Le premier bouton, le plus important permet de lancer une fenêtre popup permettant de choisir les caractéristiques de votre comptage, il est nécessaire de cocher les 3 options "Display result", "clear result" et "add to manager". Il vous est aussi possible de rajouter des informations pour votre comptage comme la taille de vos particules et leurs circularités.

cf : ci-dessous.

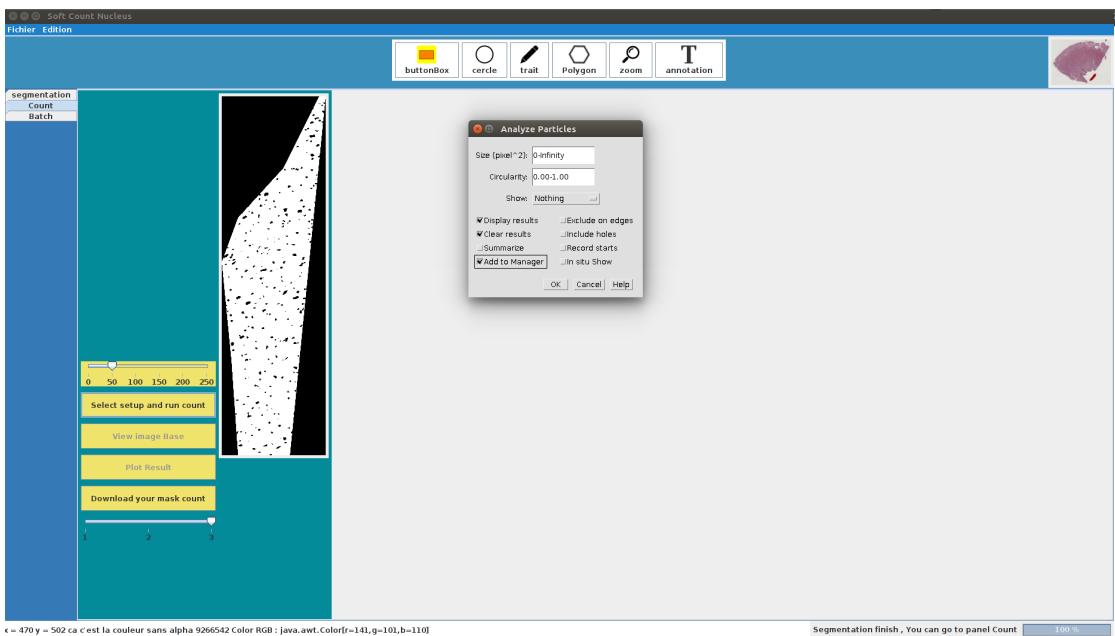


FIGURE 7: Aspect global du logiciel réalisé. Les différentes zones sont décrites ci-dessous.

Cela permet donc d'obtenir le tableau que l'on trouve ci-dessous regroupant les informations des noyaux avec leur périmètres (en micron) ainsi que leurs aires (en micron carré). Ce tableau est téléchargeable en .csv afin de pouvoir effectuer des tests statistiques sur les données obtenues.

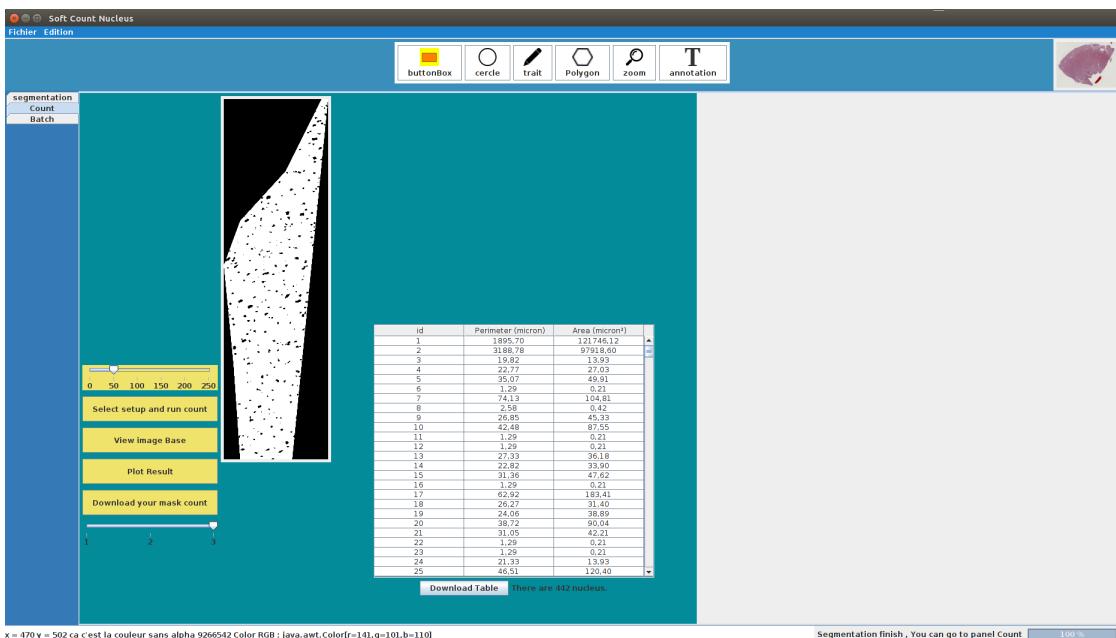


FIGURE 8: Affichage du tableau permettant d'avoir les informations sur les noyaux.

Le 2ème bouton permet quand à lui de voir l'image non segmenté et ainsi de vérifié la segmentation.

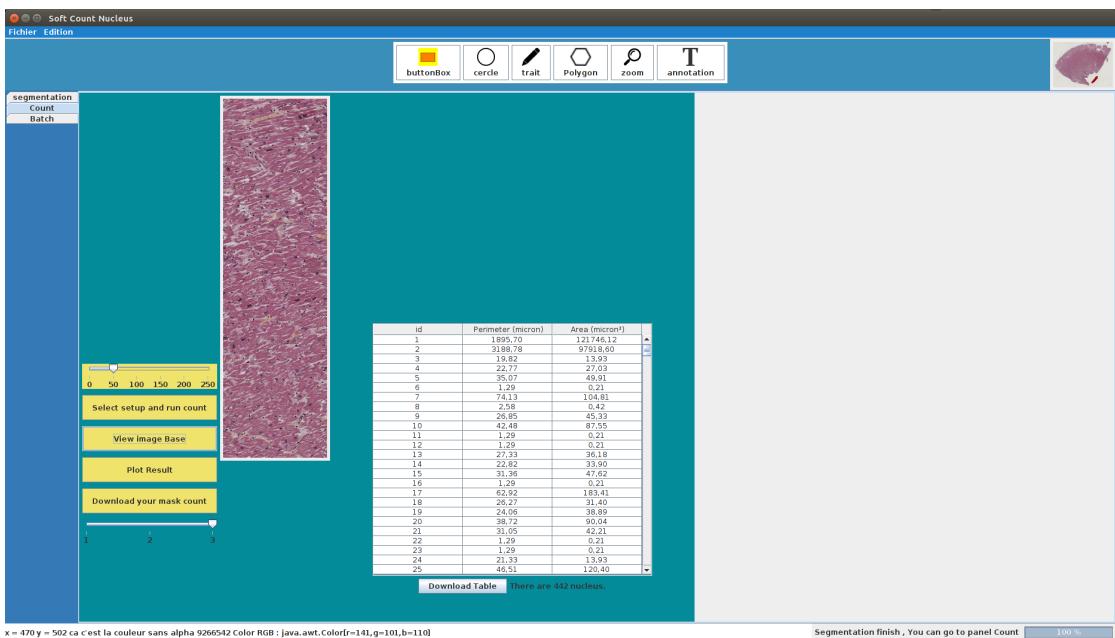


FIGURE 9: Visualisation de la ROI non segmenté.

Le 3ème bouton permet de visualiser sur un graphique la répartition de la taille des noyaux.

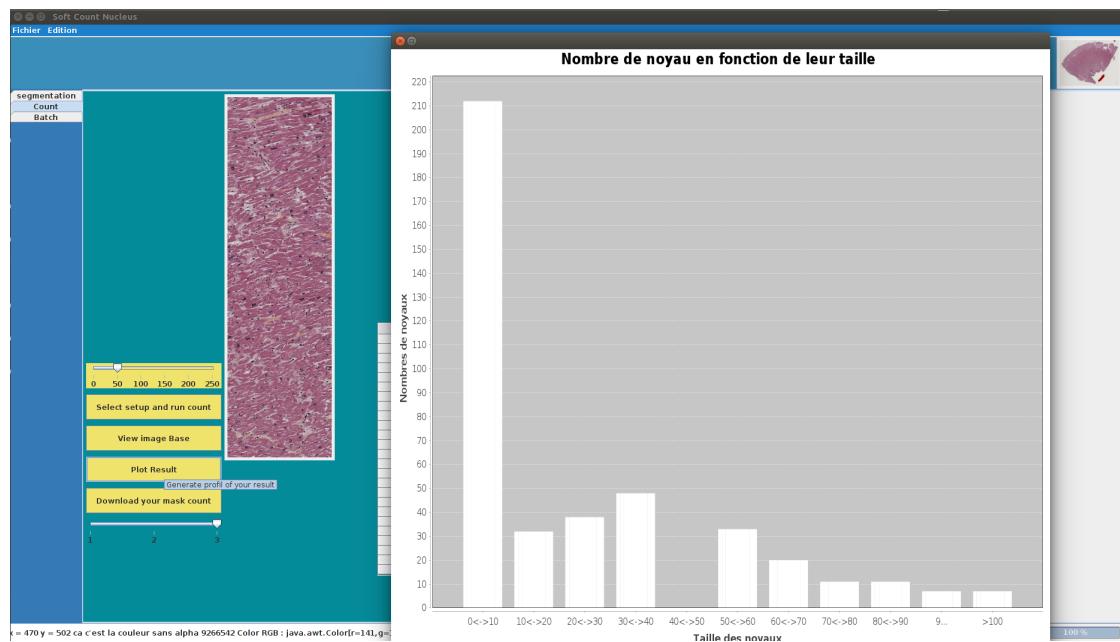


FIGURE 10: Aspect global du logiciel réalisé. Les différentes zones sont décrites ci dessous.

Le 4ème bouton permet de sauvegarder votre image en .tiff si vous le souhaitez.

1.7 Onglet Batch

Lors de l'ouverture de cette onglet il va vous être demander 2 informations, la première étant votre adress mail afin de vous notifiez l'aboutissement de vos travaux, la seconde va être un dossier où vous souhaitez sauvegarder les informations (information sur les noyaux comptés, vos masques). Les fichiers csv ainsi que les masques (.zip) contenant les statistiques sur les images seront sauvegardés automatiquement dans ce dossier.

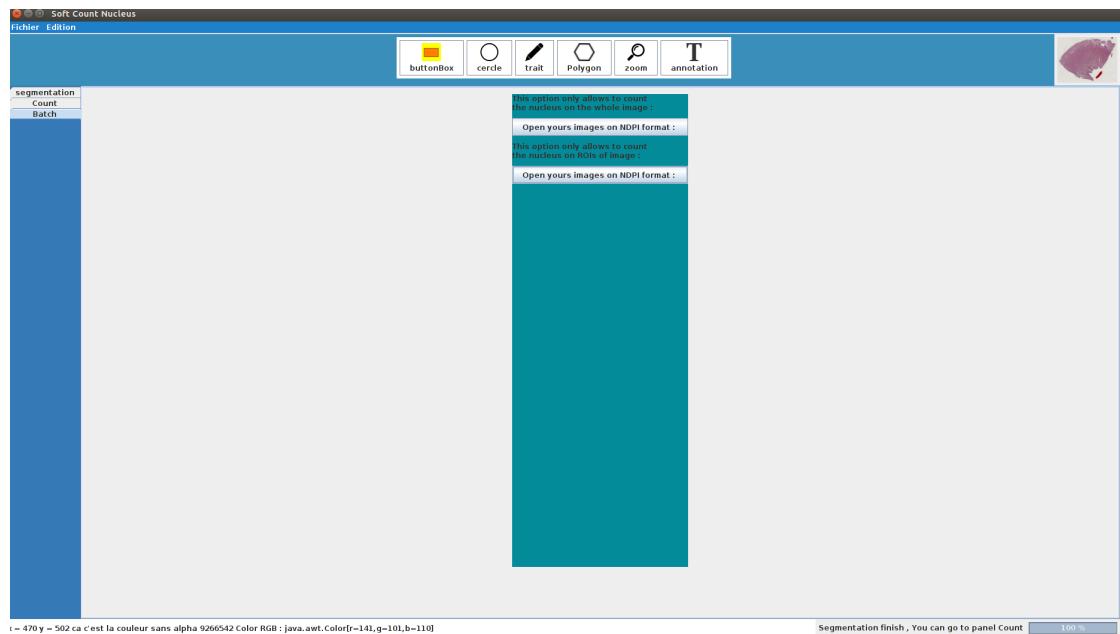


FIGURE 11: Aspect du Panel Batch

Il va donc être visible 2 boutons, un permettant de segmenter vos images entièrement et un permettant de segmenter sur plusieurs images des ROIs que vous pouvez tracer à l'aide de la souris (de la même manière qu'au point 1.4.2), une validation dans ce cas est nécessaire par l'intermediaire d'un bouton. Il faudra jouer avec le slider présent ci-dessous.

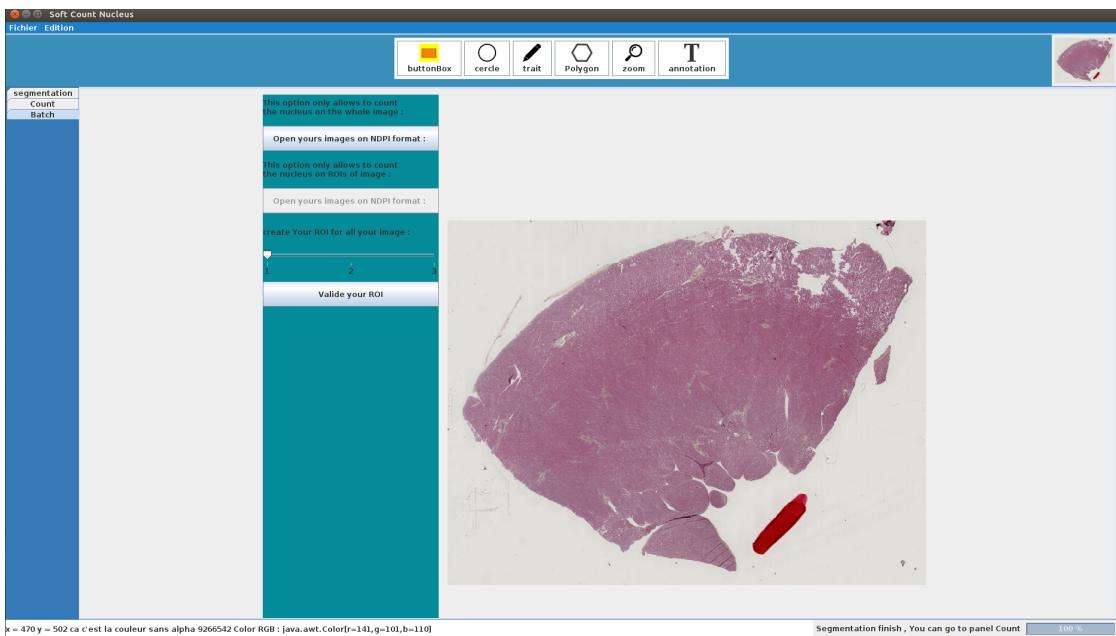


FIGURE 12: Ouverture des images à segmenter avec des ROI.

Il suffit donc ici de tracer vos ROI sur chaque image et ensuite de valider le comptage se fera automatiquement ainsi que le téléchargement pour chaque image et le téléchargement de vos rois segmentés.

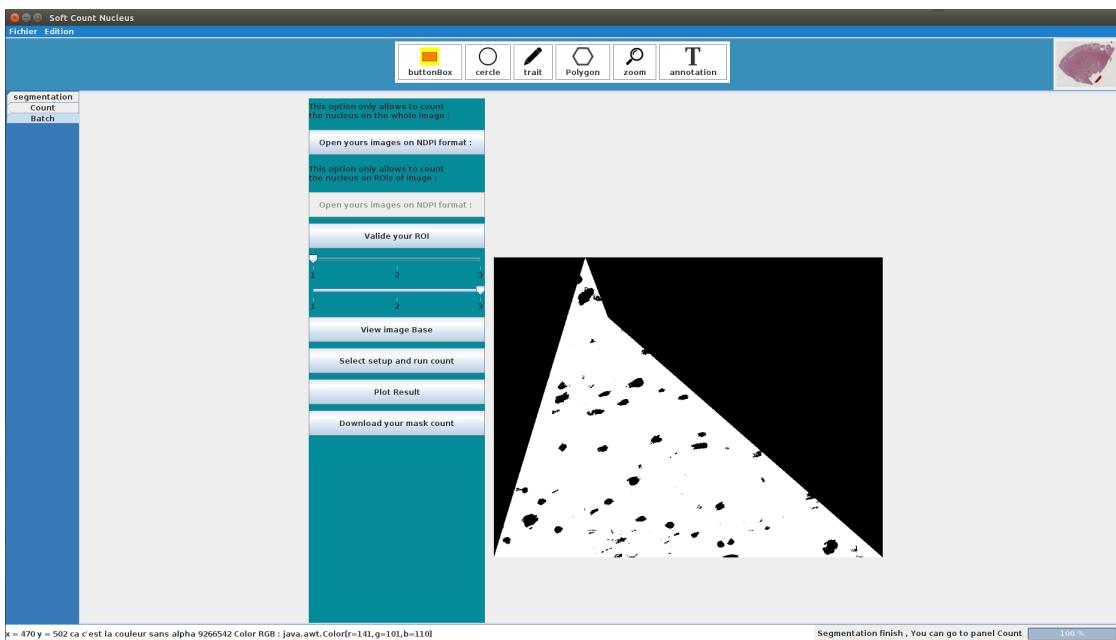


FIGURE 13: Visualisation de l'onglet après segmentation de plusieurs ROI sur plusieurs images.

Il est donc visible grâce au 2 slider (celui du haut pour les images et celui du bas pour les ROIs) de naviquer entre vos image. Ci dessous il est possible de voir 4 boutton permettant la même chose qu'au point 1.5.

2 Informations Developpement informatique

2.1 API utilisée

2.1.1 Openslide

L'API permettant l'ouverture et la lecture du format ndpi et celle d'openslide, celle ci permet notamment de créer des thumbnail des image au niveau 0.

2.1.2 Weka

L'API permettant la classification des images et comportant l'algorithme de machine learning est nommée weka. Il est présent sur FIJI, appeler "Trainable weka segmentation".

2.1.3 ImageJ

L'api d'imageJ permet dans ce soft 2 fonctionnalités indispensables, le comptage des noyaux grâce à l'"analyse particle" ainsi que la déconvolution couleur avec le "colorDeconv". Il permet aussi le traitement des images avec par exemple la binarisation de ces dernières.

2.2 Configuration matérielle

Les données sont stockées sur un serveur hébergé à Micropicell, et maintenu par le SNPS : Micropicell. Sur ce serveur, un répertoire est partagé avec le serveur Bird. Le serveur Bird est hébergé au data center (à vérifier) : il s'agit d'un serveur de calcul puissant, et est maintenu par la plateforme Bird (64 CPU et 256 Go de RAM). Une machine virtuelle est déployée de manière à offrir une interface graphique avec un bureau (KDE sous linux). Un lien vers l'application est disponible, et l'utilisateur utilise la machine virtuelle pour interagir avec le logiciel. Attention une seule connection à la fois est possible, d'où l'importance de la réservation (gratuite). Dans un premier temps l'accès au soft ne se fera que par le personnel plateforme Micropicell.