

---

## PROJET 3 - COMPTAGE DE CHROMOSOMES

---

Adrian ZURMELY, Nicolas MENDIBOURE, Son-Michel DINH

5BS

2021 - 2022

Enseignant :

Carole FRINDEL

6 janvier 2022

## 1 Introduction

L'aneuploïdie, qui se définit par un nombre aberrant de chromosomes dans une cellule, est une caractéristique de divers syndromes associés à des anomalies cognitives et développementales. En outre, l'aneuploïdie est considérée comme étant un motif distinctif des cellules cancéreuses. L'idée de ce projet est d'être capable de compter des chromosomes à partir d'images acquises par microscopie à fluorescence avec des marquages spécifiques de la chromatine.

## 2 Matériels et Méthodes

### 2.1 Données

Des images ont été acquises par microscopie en épifluorescence. Elles comprennent deux canaux : le canal bleu correspondant aux noyaux (marquage spécifique de l'ADN et donc du noyau par marquage DAPI) et le canal vert correspondant à la chromatine (marquage à la GFP). Ces images ont une dimension de 1024x1024 pixels dans laquelle la résolution dans le plan est 0.1395x0.1395  $\mu\text{m}$ .

### 2.2 Méthode

Afin d'analyser ces images, les étapes que nous avons retenues sont les suivantes :

1. Lire les images associées aux deux canaux bleu et vert ;
2. Traitement de qualité du canal bleu : égalisation de l'histogramme + filtre médian + seuil manuel (valeur arbitraire) ;
3. Segmentation et détection des régions cellulaires par méthode Watershed ;
4. Isolation de chaque région cellulaire obtenue par Watershed (Rognage) ;
5. Isolation des mêmes régions cellulaires sur le canal vert ;
6. Seuillage manuel à l'aide du maximum d'intensité sur chaque région cellulaire isolée issue du canal vert, comptage des chromosomes par segmentation (méthode Watershed).

## 3 Résultats

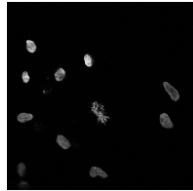
### 3.1 Pré-traitements des images

En termes de pré-traitements afin d'améliorer la qualité de l'image du canal bleu et la rendre plus exploitable dans le cadre de ce projet, nous avons essayé plusieurs méthodes : (i) renforcement du contraste ; (ii) Égalisation de l'histogramme et filtrage médian ; (iii) Filtre passe-bas par transformée de Fourier pour réduire le bruit.

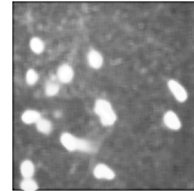
Nous avons tenté de renforcer le contraste puisque nous avions des images en niveau de gris. Cependant cela ne faisait que confondre les cellules.

Le filtre passe-bas par transformée de Fourier n'était pas non plus convaincant car cela ne faisait que rendre plus floue l'image d'origine.

La meilleure méthode pouvant nous donner des noyaux de cellules distincts sous forme binaire et avec le moins de bruit dans le fond est la méthode (ii) avec égalisation d'histogramme afin d'améliorer le contraste de notre image, puis un filtre médian pour supprimer le bruit poivre et sel créé par l'égalisation précédente sans flouter notre canal pour enfin appliquer un seuil binaire et manuel.



(a) Canal bleu après importation, image brute



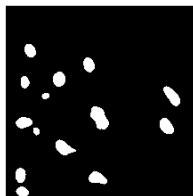
(b) Canal bleu après pré-traitement

FIGURE 1 – Comparaison entre l'image avant et après pré-traitement

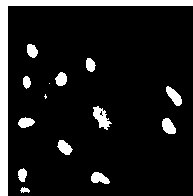
Pour l'image du canal vert, nous avons effectué ces traitements sur chaque région cellulaire isolée après les avoir isolé à partir des régions obtenues de l'image du canal bleu.

### 3.2 Localisation des noyau avec le canal bleu

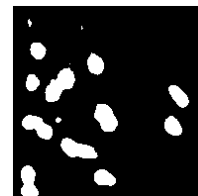
Pour différencier et localiser chaque cellule, nous avons décidé de faire un seuillage. La raison de ce traitement est que l'observation de cette image nous a conduit à dire qu'elle ne contenait que deux informations : les noyaux colorés au DAPI et le fond, différenciés par rapport aux niveaux de gris. Or la définition d'un seuil nous permet d'obtenir une image binaire qui met en évidence les noyaux par rapport au fond (1 pour un noyau et 0 pour le fond). Pour cela, nous avons effectué un seuil manuel assez stringent (à 6,  $2.10^4$  sur une gamme allant jusqu'à 65536 (16bits)) sur l'image pré-traitée, le même seuil manuel sur l'image non pré-traitée et finalement un seuil Otsu sur l'image pré-traitée. Le seuil manuel a été choisi en étudiant l'histogramme des images à seuiller.



(a) Seuil manuel  
sur image traitée



(b) Seuil manuel sur  
image non traitée



(c) Seuil automatisé  
Otsu sur l'image traitée

FIGURE 2 – Comparaison entre seuil manuel sur image traitée, seuil manuel sur image non traitée et seuil Otsu sur image traitée

Une fois que les noyaux sont visuellement bien séparés du fond, nous avons décidé d'effectuer une segmentation grâce à la méthode Watershed en raison de son efficacité sur des images binaires comportant des zones bien définies comme vu en cours. Le but de cette manipulation est de délimiter les noyaux les uns des autres pour pouvoir compter leurs chromosomes respectifs de manière individuelle.

Une fois qu'on a obtenu chaque région cellulaire, nous avons isolé et découpé chaque image de noyau séparément grâce aux coordonnées de chaque zone segmentées en rognant une zone rectangulaire par rapport aux valeurs minimales et maximales en x et en y des pixels blancs (délimitation des noyaux). Nous obtenons ainsi 14 images découpées correspondant à 14 noyaux.

### 3.3 Détection des chromosomes au sein des noyau avec le canal vert

Nous avons à l'étape précédente, récupéré les noyaux des cellules détectés à l'aide du canal bleu et l'image obtenue par microscopie à fluorescence avec une coloration au DAPI. Nous avons donc récupéré les zones de ces cellules détectés sur le canal bleu et isolé ces mêmes zones sur le canal vert, afin d'essayer de détecter la chromatine des chromosomes colorée à la GFP. Ces zones isolées à partir du canal bleu sur l'image de fluorescence à la GFP sont disponibles Figure 3.

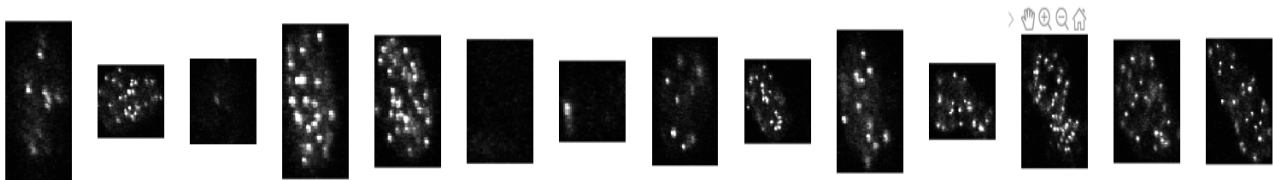


FIGURE 3 – Zones isolées de la coloration GFP sur la chromatine à partir des zones isolées comme étant des noyaux à l'aide de la coloration au DAPI.

Ainsi avec les noyaux isolés à l'aide du canal bleu, nous essayons de faire un traitement sur ces zones sur le canal vert.

Le premier traitement que nous avons fait est un seuillage en fonction de la valeur maximale des pixels sur chaque zone isolée. Ce seuillage donnant des nombres de chromosomes différents selon la stringence du seuil. Nous avons ensuite effectué une segmentation à l'aide de la méthode de Watershed pour (tenter de) compter les chromosomes.

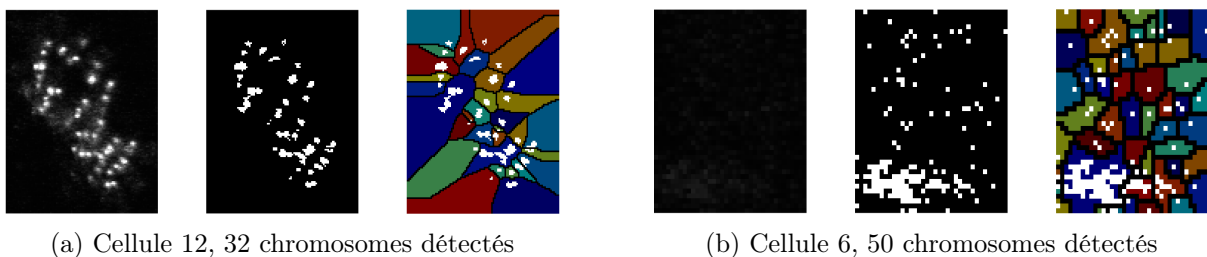


FIGURE 4 – Comparaison de la cellule 12 à gauche et la cellule 6 à droite. De gauche à droite : zone de l'image découpée au niveau du noyau, seuil en fonction de la valeur maximale des pixels, segmentation watershed sur zone seuillée.

### 3.4 Statistiques sur le nombre de chromosomes comptés

Le comptage des chromosomes détectés dans chacune des cellules détectées est disponible dans la Table 1 ci-dessous et semble à peu près cohérent avec nos observations à l'oeil nu à partir de l'image brute. En revanche, nous constatons une grosse différence pour le noyau numéroté 6 pour lequel nous n'avions au départ, vu aucun noyau. L'algorithme quant à lui détecte un noyau (visible à l'égalisation de l'histogramme) et ceci a pour effet de faire un seuil sur une zone quasiment noire avec un peu de bruit pour laquelle on obtient un seuillage qui produit un grand nombre de régions suite à la méthode de Watershed expliquant ainsi le nombre important de chromosomes détectés par celui-ci.

TABLE 1 – Comptage des chromosomes observés à l'oeil nu et face à ceux détectés par notre script.

#Noyau	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nb Chr comptés à la main	9	26	1	20	30	0	1	8	22	12	16	42	20	24
Nb Chr compté par Watershed	5	24	4	18	22	50	1	7	18	11	17	32	21	26

Sachant que ce sont des cellules humaines, nous devrions observer 46 chromosomes par cellule. Or ce que nous détectons est généralement bien en dessous de 46 chromosomes.

## 4 Discussions et conclusion

Pour les différents seuils que nous avons appliqués, ceux-ci sont tous manuels, c'est à dire que nous avons nous même sélectionné les valeurs de ces seuils en regardant dans les histogrammes de chaque image. Cette méthode n'est donc pas automatique et nécessite l'intervention d'une personne pour analyser l'histogramme, empêchant notre script de se dérouler comme un pipeline. Pour faire face à ce problème nous avons tenté de proposer une méthode plus automatique : la méthode de seuillage Otsu. Comme on peut le voir en figure 2c, l'image traitée avec Otsu ne permet pas d'identifier clairement les noyaux des cellules car certains d'entre eux finissent confondus. Nous avons donc décidé d'écarter cette méthode et de rester sur un seuil manuel pour ce projet.

Concernant les limites matérielles de ce projet, les images mises à disposition, bien que codées en 16bits, manquaient légèrement de résolution (surtout l'image verte pour les chromosomes). De plus il est possible que chaque cellule soit dans une phase de division différente ou que la fluorescence ne permette pas d'observer certains chromosomes faussant alors le comptage. L'orientation des chromosomes en 2D laisse donc place à des confusions, l'idéal aurait été d'avoir plusieurs images dans des orientations différentes ou bien une carte en 3D afin de mieux distinguer nos chromosomes.

En guise de conclusion pour ce projet, nous avons appris à mieux connaître certains outils utilisés en traitement d'image. Avec l'autonomie qui nous a été accordée nous avons pu expérimenter plusieurs méthodes pour les étapes de pré-traitement, de traitement et de comptage afin de sélectionner ce qui nous a semblé la plus optimale – si tant est qu'il soit possible de compter directement les chromosomes à partir de ce type d'image – bien que dans notre cas celle-ci ne soit pas automatique.