



HAL
open science

IMAGERIE EN FLUX PAR MICROSCOPIE HOLOGRAPHIQUE DIGITALE POUR L'IDENTIFICATION D'ORGANISMES DU NANOPLANCTON

Ahmed El Mallahi, Eva-Maria Zetsche, Catherine Yourassowsky, Filip Meysman,
Francis Dubois

► To cite this version:

Ahmed El Mallahi, Eva-Maria Zetsche, Catherine Yourassowsky, Filip Meysman, Francis Dubois. IMAGERIE EN FLUX PAR MICROSCOPIE HOLOGRAPHIQUE DIGITALE POUR L'IDENTIFICATION D'ORGANISMES DU NANOPLANCTON. 3ème rencontre francophone d'holographie numérique appliquée à la métrologie des fluides, Nov 2014, Ecully, France. <hal-01112771>

HAL Id: hal-01112771

<https://hal.science/hal-01112771v1>

Submitted on 3 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No
Derivative Works - International License

IMAGERIE EN FLUX PAR MICROSCOPIE HOLOGRAPHIQUE DIGITALE POUR L'IDENTIFICATION D'ORGANISMES DU NANOPLANCTON

Ahmed, El Mallahi

Microgravity Research Center, Université libre de Bruxelles,
50 Avenue F. Roosevelt, CP 165/62, 1050 Bruxelles, Belgique
Ahmed.El.Mallahi@ulb.ac.be

Eva-Maria, Zetsche

Royal Netherlands Institute for Sea Research – NIOZ Yerseke,
PO Box 140, 4400 AC Yerseke
Eva-Maria.Zetsche@nioz.nl

Catherine, Yourassowsky

Microgravity Research Center, Université libre de Bruxelles,
50 Avenue F. Roosevelt, CP 165/62, 1050 Bruxelles, Belgique
Catherine.Yourassowsky@ulb.ac.be

Filip, Meysman

Royal Netherlands Institute for Sea Research – NIOZ Yerseke,
PO Box 140, 4400 AC Yerseke
Filip.Meysman@nioz.nl

Frank, Dubois

Microgravity Research Center, Université libre de Bruxelles,
50 Avenue F. Roosevelt, CP 165/62, 1050 Bruxelles, Belgique
Frank.Dubois@ulb.ac.be

MOTS CLES

Classification holographique, organismes planctoniques, holographie digitale, imagerie en flux

RESUME

L'identification et classification taxonomique des organismes planctoniques s'effectuent habituellement avec des techniques de microscopie classique, ce qui demande beaucoup de travail, d'effort et de temps. Pour remédier à cela, de nouvelles techniques d'identification automatisée, comme la cytométrie en flux, ont été investiguées ces dernières années. Pour améliorer l'analyse et l'identification des organismes planctoniques, de récents développements se sont focalisés sur l'imagerie en flux, c'est-à-dire la capacité d'acquérir des images de cellules planctoniques dans un flux d'eau. Les systèmes d'imagerie en flux traditionnelles sont basés sur la microscopie en champ clair, et sont soumis à plusieurs problèmes, comme par exemple la migration des cellules hors du plan de netteté, qui décroît la performance de la classification. Nous démontrons ici que la combinaison de la microscopie holographique digitale (MHD) et de l'imagerie en flux [1] améliore la détection et la classification d'organismes planctoniques. En effet, en plus de l'information d'intensité classique, la MHD fournit une information de phase quantitative, qui permet de générer un ensemble d'attributs discriminants pour la classification. De plus, la possibilité de pouvoir

remettre au net numériquement des organismes enregistrés flous augmente considérablement la profondeur d'investigation et permet le calcul précis des attributs de classification. En effet, pour qu'un attribut soit bien représentatif, il doit être calculé dans le plan de netteté de l'organisme.

Des organismes planctoniques ayant des formes similaires ont été identifiés et classifiés avec succès à partir d'hogrammes enregistrés à l'aide d'un MHD fonctionnant avec une source lumineuse partiellement cohérente. Les attributs basés sur l'information de phase quantitative se sont révélés très efficaces et ont permis d'atteindre un taux de classification correcte de 92.4%.

I. CLASSIFICATION HOLOGRAPHIQUE D'ORGANISMES

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés à l'identification de trois organismes du nanoplancton : deux espèces de cyanobactéries, *Cyanothece* sp. et *Stanieria* sp. et une espèce d'algue verte, *Chlorella autotrophica*. Ces trois organismes ont été choisis car ils présentent une grande similarité tant dans leur formes, leur couleurs que dans leurs tailles, comme on peut le voir sur la Figure 1. Ils présentent en outre une forme sphérique simple (de 5 µm de diamètre), ce qui rend leur discrimination très complexe. Ces cultures sont issues de la collection de culture de Yerseke (NIOZ-Yerseke, The Netherlands).

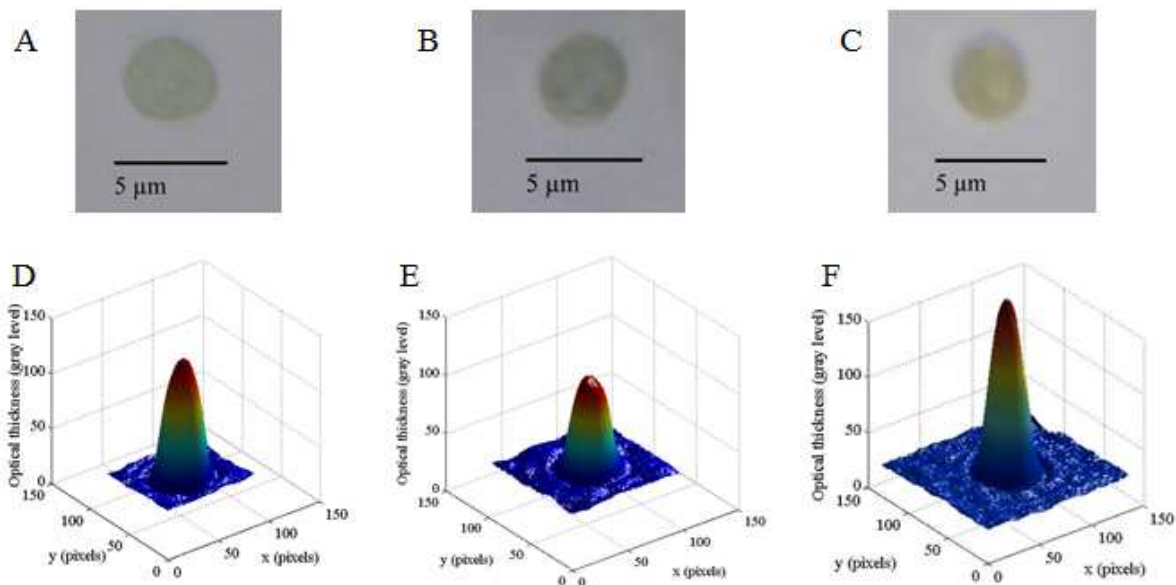


Figure 1: Ligne du haut: Trois organismes étudiés : les cyanobactéries (A) *Cyanothece* sp. et (B) *Stanieria* sp. et (C) l'algue verte *Chlorella autotrophica*, où l'on remarque la grande similarité de tailles et de formes entre ces trois organismes à classifier. (Images prises avec un microscope à champ clair Zeiss Axioplan).

Ligne du bas: Représentation pseudo-3D des images de phases des trois organismes obtenues à partir des hologrammes digitaux : *Cyanothece* sp. (D), *Stanieria* sp. (E) et *Chlorella autotrophica* (F). L'épaisseur optique (axe-z) permet d'observer clairement des différences entre les informations de phases de ces trois organismes aux formes similaires, ce qui permet d'améliorer les performances de classifications.

Une fois les organismes détectés automatiquement et remis nette [2-3], une procédure de classification holographique a été mise au point. La première étape consiste à extraire une série d'attributs caractérisant chacun des organismes des trois espèces. Des attributs morphologiques et de textures sont calculés pour classifier les organismes. Les attributs de

formes, obtenus après segmentation, sont calculés à partir du contour extérieur de l'organisme et sont composés de : l'aire, le périmètre le grand et le petit axe, l'excentricité et le diamètre circulaire équivalent. Les attributs de textures (6 au total) sont calculés à partir de l'information d'intensité et également de phase, utilisant ainsi toute l'information interférométrique disponible grâce aux hologrammes digitaux.

L'ensemble des attributs (6 de forme, 6 de texture d'intensité et 6 de texture de phase) est alors utilisé pour la classification des trois organismes nanoplanctoniques. Cette classification est basée sur une procédure de machines à vecteurs de supports (SVMs) [5], dont l'évaluation est effectuée au moyen d'une méthode de validation croisée imbriquée.

Les résultats de la procédure de classification sont illustrés sur la Figure 2 où un niveau d'identification globale de 92.4% est obtenu pour l'ensemble des trois organismes. Presque tous les *Chlorella* ont été correctement identifiées (97.8%), tandis que le taux de classification des *Cyanothece* est légèrement inférieur avec 90.8%. Les cyanobactéries *Staniera* obtiennent le score le plus bas avec 88.6%. Toutes les *Staniera* mal-classées ont été labélisées comme des *Cyanothece* et inversement. Cela peut s'expliquer par la très grande similarité de forme mais également d'épaisseur optique entre les deux organismes, comme on peut le voir sur la Figure 1.

Classes réelles	Classes estimées			Total (%)
	<i>C. autotrophica</i>	<i>Cyanothece</i>	<i>Staniera</i>	
<i>Chlorella autotrophica</i>	97.8 (± 2.6)	0.8 (± 0.2)	1.4 (± 0.9)	100
<i>Cyanothece</i> sp.	0.0 (± 0)	90.8 (± 2.6)	9.2 (± 0.7)	100
<i>Staniera</i> sp.	0 (± 0)	11.4 (± 0.9)	88.6 (± 2.3)	100

Figure 2: Matrice de confusion des performances moyennes de la procédure de classification (en % ± SD) pour les trois organismes étudiés par la méthode de validation croisée à 10 niveaux.

CONCLUSIONS

Dans cette étude, nous avons mis au point une procédure de classification holographique d'organismes qui permet, grâce entre autres à l'information de phase quantitative, d'extraire des hologrammes digitaux des attributs significatifs et de correctement discriminer des organismes ayant des formes et des tailles très similaires.

RÉFÉRENCES

- [1] Yourassowsky, C., & Dubois, F. (2014). High throughput holographic imaging-in-flow for the analysis of a wide plankton size range. *Opt. Express*, **22**, 6661-6673.
- [2] El Mallahi, A., Minetti, C & Dubois, F. (2013). Automated three-dimensional detection and classification of living organisms using digital holographic microscopy with partial spatial coherent source: application to the monitoring of drinking water resources. *Appl. Opt.*, **52**, A68-A80.
- [3] El Mallahi, A.(2013). Automated 3D Object Analysis by Digital Holographic Microscopy, PhD, Université libre de Bruxelles, 158 pp.
- [4] Zetsche, E.-M., El Mallahi, A., Dubois, F., Yourassowsky, C., Kromkamp, J., & Meysman, F. (2014). Imaging-in-flow: Digital holographic microscopy as a novel tool to detect and classify nanoplanktonic organisms. *Limnol. Oceanogr-Meth* (accepted, to be published).
- [5] Chang, C.-C., & Lin, C.-J. (2011). Libsvm: A library for support vector machines. *ACM Trans. Intell. Syst. Technol.*, **2**, 1-27.