

## **Segmentation par logique floue pour l'estimation du nombre de globules rouges dans des images multi-spectrales de frottis sanguin non marqué**

**Olivier K. BAGUI<sup>1,2</sup>, J. T. ZOUEU<sup>1\*</sup> et E. MEGNASSAN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Instrumentation Image et Spectroscopie, INP-HB, DFR-GEE, BP 1093  
Yamoussoukro, Côte d'Ivoire*

<sup>2</sup>*Laboratoire de Physique Fondamentale et appliquée, UNA, UFR-SFA, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire*

---

\* Correspondance, courriel : [jeremie.zoueu@inphb.edu.ci](mailto:jeremie.zoueu@inphb.edu.ci)

### **Résumé**

Dans ce travail, nous avons étudié l'introduction de la logique floue dans les processus de segmentation d'images multi-spectrales de frottis sanguin. Notre approche s'appuie sur l'utilisation de l'analyse en composante principale (ACP) sur le jeu d'images spectrales, suivi de l'utilisation de la logique floue sur la première composante principale des images, comme méthode de segmentation des globules rouges. Elle nous a permis de définir une appartenance graduelle des globules rouges à une classe, facilitant ainsi leur comptage. Le résultat donne lieu à 1.53% d'erreur par rapport au comptage manuel, et nous montre que cette technique permet d'atteindre des résultats proches de ceux des méthodes standards, quant à l'estimation du nombre de globules rouges dans l'image d'un frottis sanguin.

**Mots-clés :** *logique floue, segmentation, images multi-spectrales, parasitemie, analyse en composante principale.*

### **Abstract**

**Segmentation by fuzzy logic to estimate the number of red blood cells in multi-spectral images of unstained blood smear**

In this work, we studied the inclusion of fuzzy logic in the segmentation process of multispectral images of blood smear. Our approach is based on the use of principal component analysis (PCA), followed by the application of fuzzy logic to the first principal component images as segmentation method of red blood cells. It allowed us to define a gradual membership of red blood cells to a class, thus facilitating their counting. The results give rise to 1.53% of error compared to manual counting; this shows that this technique can provide a reliable data information about the estimated number of red blood cells in the image of an unstained blood smears.

**Keywords :** *fuzzy logic, image segmentation, multi-spectral images, parasitemia, principal component analysis.*

## 1. Introduction

Une physique à l'échelle particulière permet une meilleure compréhension de divers processus biologiques de la matière, aussi bien à l'état normal qu'à l'état pathologique. En effet, de nombreux phénomènes, qu'ils soient macroscopiques ou microscopiques, telle que l'infection des globules rouges par le plasmodium, ont des explications physiques constituant des fondements physiologiques. L'utilisation de l'imagerie médicale qui constitue aujourd'hui un domaine pluridisciplinaire en plein essor rentre dans ce cadre. Son développement devrait donc permettre d'apporter une expertise médicale pour l'aide au diagnostic. Ce travail rentre dans ce cadre et vise à apporter une aide au diagnostic automatique du paludisme. En effet, toutes les formes de paludisme sont consécutives à des parasites (plasmodium) qui se transmettent par une piqûre de types particuliers de moustiques [1]. Le paludisme est la première raison de consultation et d'hospitalisation en Côte d'Ivoire [2]. Il cause de nombreux décès et a de ce fait, un impact négatif sur le développement. De nombreuses tentatives pour l'éradication de cette maladie sont menées, mais elle reste encore un problème d'actualité. Cette maladie qui est transmise par la pique de moustiques, s'attaque à notre système sanguin, et particulièrement aux globules rouges, dont le rôle consiste essentiellement à l'approvisionnement des cellules en oxygène et à l'élimination du gaz carbonique produit par ces dernières.

À ce jour, en l'absence d'une prise en charge rapide et appropriée, le paludisme peut entraîner le décès du patient. Le diagnostic rapide est par conséquent, une urgence médicale car, le diagnostic précoce du paludisme réduit l'intensité de la maladie et permet d'éviter qu'elle ne devienne mortelle. L'examen microscopique d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse demeure la méthode de référence en matière de sensibilité et de spécificité. Il permet de confirmer la maladie, d'identifier l'espèce plasmodiale en cause et d'évaluer la parasitemie. Toutefois, ce procédé n'a pas été modifié depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Le diagnostic par microscopie est subjectif car la fiabilité de cet examen dépend aussi de l'expérience de la personne réalisant cet examen [3]. Notons que le cœur de l'estimation de la parasitemie est le comptage des cellules. L'un des défis de la précision du comptage est le problème des cellules accolées ; les cellules accolées sont perçues dans les codes de comptage classiques comme des cellules uniques ; nous avons donc mis en œuvre une technique basée sur la logique floue pour le comptage automatique des globules rouges, ouvrant ainsi les voies au diagnostic automatisé du paludisme [4].

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Acquisition des images

Le système d'acquisition de données a été décrit dans nos précédentes publications [5-8]. Les sources lumineuses classiques, en transmission et en réflexion ont été enlevées et remplacées, pour tous les modes, par un ensemble de 13 DELs, avec des longueurs d'onde allant de 375nm à 940nm. Une source en anneau est fixée au dispositif, à l'aide d'une fibre optique pour le mode diffusion. Les oculaires mécaniques initiaux sont de même substitués par une caméra monochrome CMOS à 12 - bit (2592 x 1944, Guppy - 503B, Vision Allied Technology, avec un capteur de MT9P031 de Micron / Aptina), avec une taille de pixel de 2,2  $\mu\text{m}$  x 2.2  $\mu\text{m}$ , qui est utilisée pour acquérir des images. Pour les modes de transmission, de réflexion et de diffusion, le système acquiert automatiquement un total de 39 images spectrales (13 images par mode), pour la même scène, en utilisant une carte d'acquisition de données (NI-DAQ) couplée à un ordinateur, qui contrôle les intensités de courant pour les réglages fins (*Figure 1*). Nous avons dans ce travail, utilisé le mode transmission, car il révèle un contraste idéal pour notre méthode.

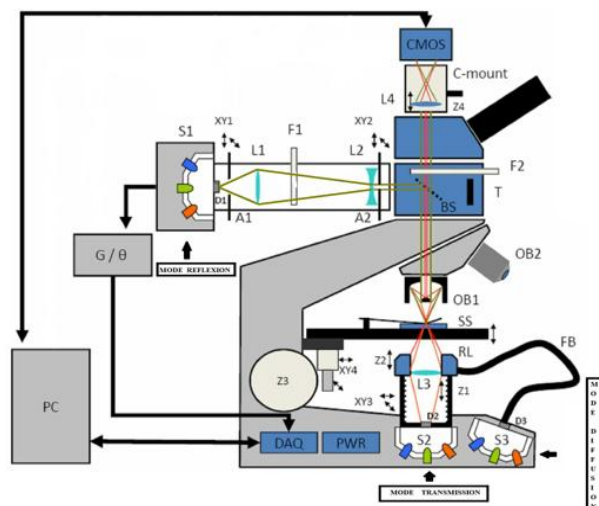


Figure 1 : Schéma du microscope multi-spectral

Les images spectrales en transmission ( $I_{Trans}$ ) sont obtenues après prétraitement comme suit, pour chaque longueur d'onde :

- Capture de l'image transmise par l'échantillon sur lame ( $I_S$ );
- Capture de l'image de la lame vide ( $I_B$ ); mesure dite de référence;
- Capture de l'image en obstruant le passage de la lumière ( $I_D$ ) : mesure dite du bruit de fond
- L'image finale  $I_T$  s'obtient comme dans **l'équation (1)**:

$$I_{Trans} = \frac{I_T - I_D}{I_B - I_D} \tag{1}$$

## 2-2. Méthode proposée

Nous pouvons résumer la démarche par l'organigramme ci-dessous (**Figure 2**)

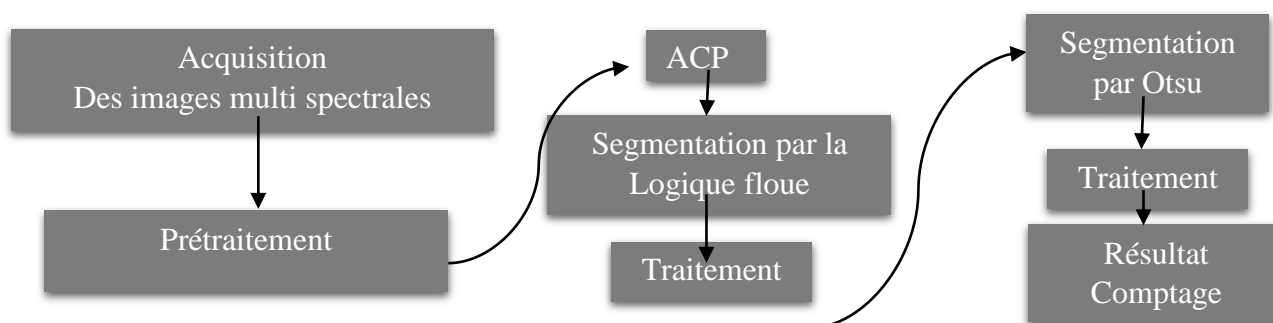


Figure 2 : Processus de comptage des globules rouges

### 2-2-1. L'Analyse en Composante Principale (ACP)

Ces méthodes visent à structurer et simplifier les données issues de plusieurs variables, sans privilégier l'une d'entre elles en particulier. Elles se proposent de fournir des représentations synthétiques de vastes ensembles de valeurs numériques, en général sous forme de visualisations graphiques.

Nous disposons d'une scène d'images multi spectrales de frottis sanguin non marqués, constituées d'enregistrement de treize capteurs spectraux pour le mode transmission. Les images de la scène ont des redondances d'informations. On souhaiterait effectuer un traitement particulier, sur une partie des données. L'analyse en composantes principales est une technique utilisée pour réduire cette redondance en conservant le maximum d'informations [6]. Elle va donc condenser les données originelles en de nouveaux groupements de façon à ce qu'ils ne présentent pas de corrélation entre eux et soient ordonnés en terme de pourcentage de variance apportée par chaque composante. Ainsi, la première composante principale contient les informations relatives à la variance maximale. La deuxième contient les informations relatives à la variance suivante. Le processus est répété jusqu'à l'obtention de la  $n^{\text{ième}}$  et dernière composante principale. Les pertes d'informations diminuent d'une étape à la suivante.

Les différentes opérations de l'ACP sont :

- le calcul des matrices de covariance et de corrélation de l'image multi spectrale ; ce sont des matrices carrées dont la dimension est égale au nombre des canaux spectraux de l'image;
- le calcul des valeurs et vecteurs propres de la matrice de covariance;
- le calcul des composantes principales de l'image multi spectrale;

Pour ces calculs, on pose : les variables suivantes  $X_1, \dots, X_{13}$  qui représentent les N pixels en niveaux de gris des treize images obtenues par les capteurs spectraux. Les moyennes de ces variables sont calculées pour  $i=1, \dots, 13$  selon *l'équation (2)*.

$$\bar{X}_i = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N X_i^j \quad (2)$$

Ces moyennes servent à calculer les covariances (*équation 3*) et les corrélations entre deux variables. La covariance entre les variables  $X_i$  et  $X_j$  est :

$$\text{Cov}(X_i, X_j) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{k=1}^N [(X_i^k - \bar{X}_i) \cdot (X_j^k - \bar{X}_j)] \quad (3)$$

La matrice de covariance Q (*équation 4*) constitue des covariances entre les variables.

$$Q = \{ \text{Cov}(X_i, X_j) \}_{13 \times 13} \quad (4)$$

on obtient la variance de chaque variable par le calcul suivant (*équation 5*):

$$\sigma_i^2 = \frac{1}{N} \cdot \sum_{j=1}^N [(X_i^j - \bar{X}_i)^2] \quad (5)$$

La matrice de corrélation S (*équation 6*) constitue des corrélations entre les variables.

$$S = \{ \text{Cor}(X_i, X_j) \}_{13 \times 13} \quad (6)$$

Le polynôme caractéristique de la matrice de covariance nous permet le calcul des valeurs propres  $\lambda_i$ . Les valeurs propres sont les valeurs qui vérifient :

$\det(Q - \lambda \cdot Id) = 0$ . Dans notre cas, on obtient treize valeurs propres  $\lambda_1, \dots, \lambda_{13}$  associées à treize vecteurs propres  $V_1, \dots, V_{13}$  pour chaque mode de géométrie, tel que  $QxV_i = \lambda_i \cdot V_i$  avec  $i=1, \dots, 13$ . A partir de ces vecteurs propres, on peut obtenir les composantes principales  $Y_i$  avec  $i = 1, \dots, I$  et  $I \leq 13$  ; On a (*équation 7*):

$$Y_i^k = \sum_{j=1}^N [V_k^j \cdot (X_i^j - \bar{X}_i)] \tag{7}$$

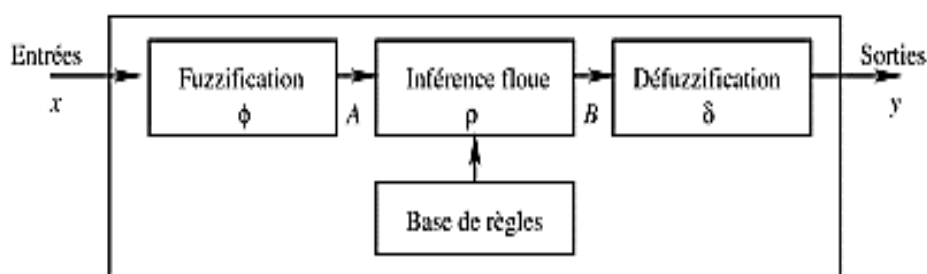
Le nombre des composantes est au plus égal à celui des canaux spectraux, treize dans notre cas. Mais nous utiliserons la première composante principale pour la suite du processus.

### 2-2-2. Segmentation par la logique floue

La segmentation est un procédé qui consiste à séparer dans une image les objets les uns des autres et de l'arrière-plan en extrayant les contours ou en segmentant en régions homogènes. L'utilisation de la logique floue en particulier dans les algorithmes de classification se développe de plus en plus pour la segmentation des images médicales. Cela est en particulier dû au fait que la théorie des sous-ensembles flous [7] est bien adaptée pour décrire des objets dont les frontières sont mal définies. En effet, la notion d'ensemble flou permet de définir une appartenance graduelle d'un élément à une classe, c'est-à-dire appartenir plus ou moins fortement à cette classe. L'appartenance d'un objet à une classe est ainsi définie par un degré d'appartenance entre 0 et 1. D'une part, les ensembles flous permettent de représenter l'information spatiale des images et son imprécision, ce qui est particulièrement utile pour la tâche de segmentation. D'autre part, ils permettent de représenter des informations très hétérogènes, provenant directement des images, ou correspondant à des connaissances a priori [8]. Une description complète est disponible dans les ouvrages de référence [9,10]

#### 2-2-2-1. Principe général

Etant donné un vecteur d'entrée  $x$  et un vecteur de sortie  $y$ , cette technique applique une loi de commande  $y = g(x)$ . Sa structure est illustrée sur la **Figure 3** [11]

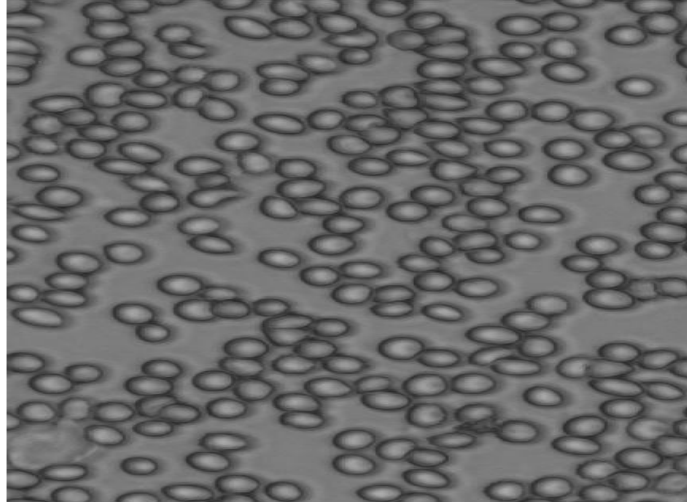


**Figure 3 : Représentation interne d'un contrôleur flou**

On observe également sur la **Figure 3** qu'on peut considérer l'application  $g$  comme la composition de trois applications, notées  $\Phi$ ,  $\rho$  et  $\bar{\Delta}$ , correspondant respectivement aux trois opérations internes du contrôleur flou : la fuzzification, l'inférence floue et la défuzzification. Les sous-ensembles flous  $A$  et  $B$  sont le résultat de la fuzzification et de l'inférence [11]

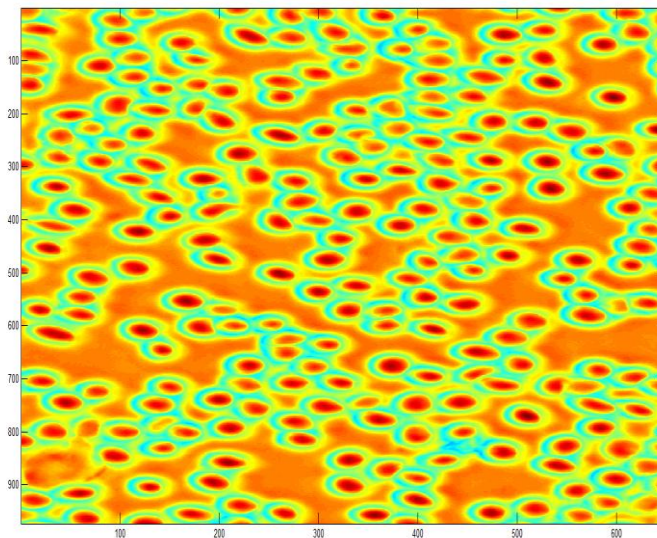
### 3. Résultats et discussion

Nous avons utilisé 10 frottis sanguin non marqué dans notre étude. Pour chaque échantillon nous avons procédé au comptage manuel et au comptage automatique avec notre algorithme. La **Figure 4** nous montre un exemple d'image à niveau de gris obtenus avec le microscope.



**Figure 4 :** Image à 435 nm d'un frottis sanguin

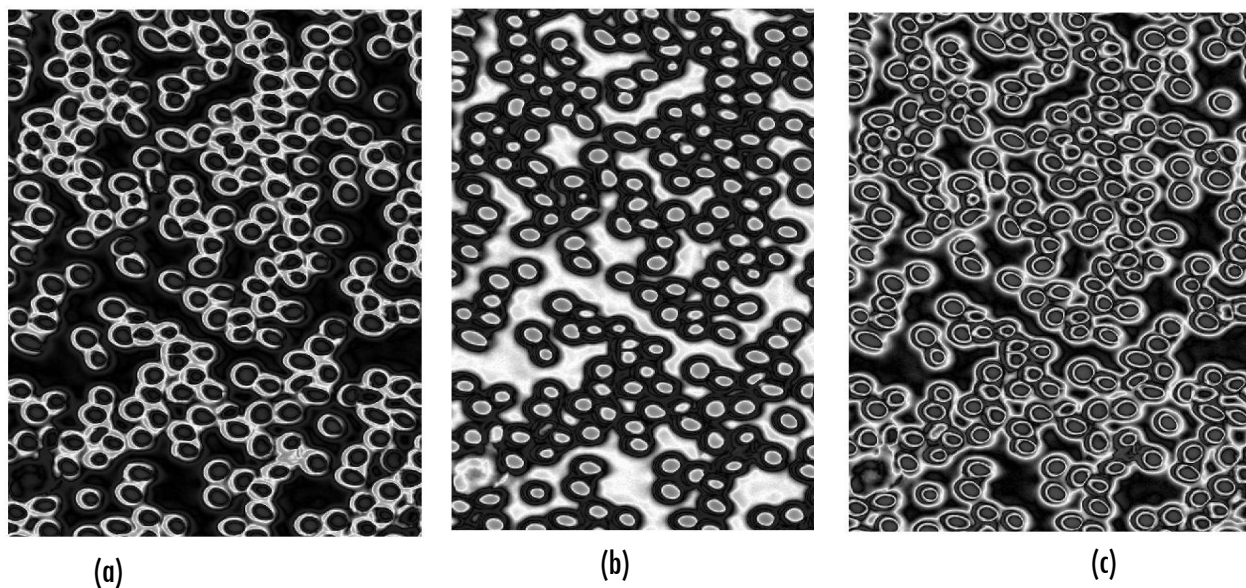
Les treize images obtenues dans le mode transmission sont regroupées en un vecteur, puis nous appliquons l'ACP à ce vecteur. La première composante principale des images est retenue car comportant le maximum d'information tel que décrit par la méthode de l'ACP. La **Figure 5** nous montre l'image de la première composante principale.



**Figure 5 :** image de la première composante principale

A cette image nous appliquons notre segmentation basée sur la logique floue. Trois classes sont nécessaires pour segmenter la zone au centre des cellules (**Figure 5**). Nous obtenons trois images correspondant aux trois classes définies dans la logique floue (**Figure 6**).



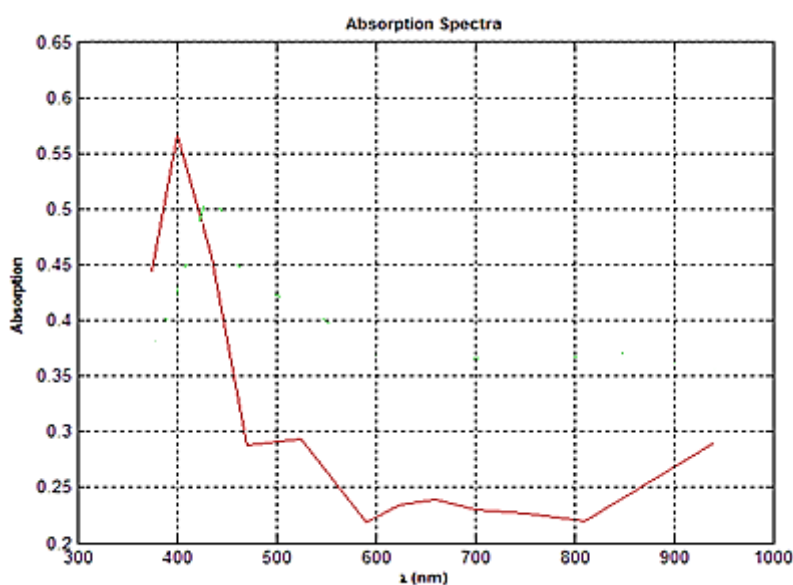


**Figure 6 :** *Images obtenues après application de la logique floue*

La **Figure 6b** présente une répartition lumineuse idéale donc un contraste idéal car les silhouettes des globules rouges sont plus discernables. Pour sélectionner cette image de façon automatique, nous multiplions chacune de ces images aux images en transmission à 400 nm puis à 590 nm qui représentent respectivement les valeurs maximale et minimale du spectre d'absorption obtenu à partir de la loi de Beer-Lambert (**équation 8**) d'un globule rouge.

$$\text{Absorbance} = -\log_{10}(\text{Transmission}); \tag{8}$$

La (**Figure 7**) nous montre le spectre d'absorption correspondant à la valeur moyenne des intensités des pixels obtenus avec notre microscope multi spectrale.



**Figure 7 :** *Spectre d'absorption d'un globule rouge*

Nous calculons le contraste global de chaque image à partir de la formule de contraste de Michelson (*équation 9*)

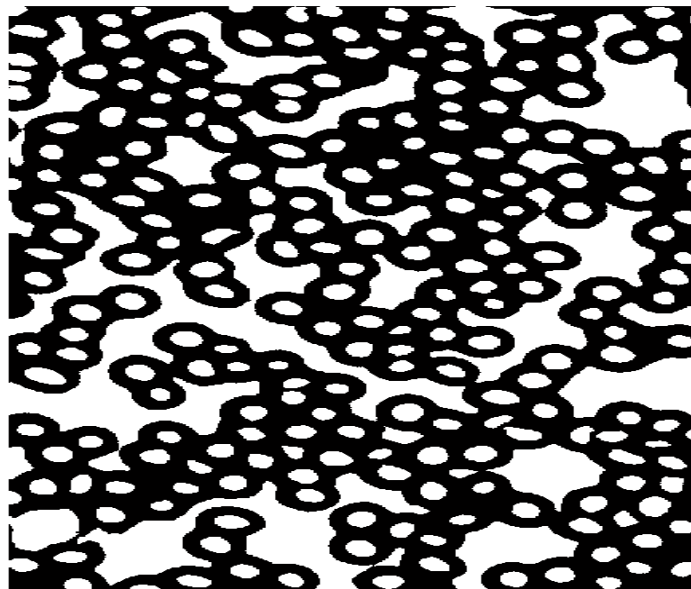
$$C = \frac{I_{400nm} - I_{590nm}}{I_{400nm} + I_{590nm}} \quad (9)$$

C représente la valeur du contraste. Le *Tableau 1* nous donne la valeur du contraste pour chaque image de la *Figure 6*.

**Tableau 1 : Valeur de C**

Images	Contraste C
6.a	0,054
6.b	0,115
6.c	0,082

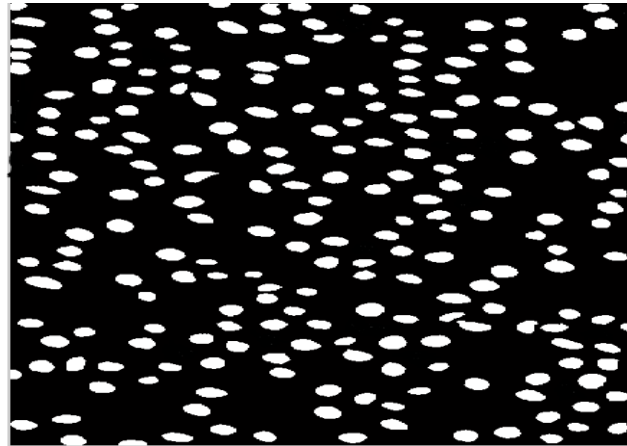
La *Figure 6b* correspond à la valeur maximale de C, et est donc utilisé comme paramètre de sélection de cette image dans notre procédure. Nous procédons ensuite à un seuillage automatique à partir de la forme de l'histogramme de l'image par la méthode de Otsu [12]. C'est aussi la réduction de cette image à niveaux de gris en une image binaire. L'algorithme suppose alors que l'image à binariser ne contient que deux classes de pixels puis calcule le seuil optimal qui sépare ces deux classes afin que leur variance intra-classe soit minimale. Nous obtenons l'image de la *Figure 8*.



**Figure 8 : Image après application du seuillage par Otsu**

Du fait de certaine imperfection dans l'image des surfaces plus grandes ne correspondant pas aux globules rouges apparaissent. Nous effectuons alors une ouverture sur cette image qui est une opération morphologique dans le but d'extraire les globules rouges. L'image obtenue sera extraite de celle de la *Figure 8*. Nous procédons ensuite à l'extraction des intensités moyennes des pixels dans chaque zone sur les treize bandes spectrales pour comparer les spectres d'absorption des surfaces à celle du globule rouge de façon automatique. On obtient l'image de la *Figure 9* qui va nous servir de base pour le comptage automatique.





**Figure 9 : Image binaire finale**

Le **Tableau 2** présente les résultats du comptage manuel comparé au comptage automatique.

**Tableau 2 : Résultat du comptage manuel compare au comptage automatique**

Numéro de l'échantillon	Nombre total de globules rouges		
	Comptage manuel	Comptage automatique	Pourcentage d'erreur (%)
1	245	238	2,86
2	235	237	0,85
3	217	215	0,92
4	254	258	1,57
5	253	249	1,58
6	242	241	0,41
7	250	257	2,8
8	228	223	2,2
9	240	238	0,83
10	228	231	1,32

**Erreur moyenne 1,53**

Le but de ce travail a été d'étudier le potentiel d'exécution du comptage automatique des globules rouge par microscopie sans intervention humaine à partir d'images multi spectrale. L'utilisation de l'analyse en composante principale sur ces images nous a permis d'extraire l'information utile, en améliorant ainsi la qualité de l'image. Seule la première composante principale des images a été retenue car contenant le maximum d'information par rapport aux autres composantes principales (**Figure 5**). L'application de la logique floue sur cette image nous a permis d'extraire le contraste idéal (**Figure 6**).

Ce résultat nous montre que la variabilité entre images peut être estimée et permet une augmentation de la performance de la classification. Elle nous a donc permis d'aboutir à un comptage dont l'erreur moyenne est d'environ 1,53 %, comparé au comptage manuel, ce qui démontre de l'efficacité de la méthode.

#### 4. Conclusion

Le diagnostic automatique du paludisme passe avant tout par la détection des globules rouges puis l'identification de la cellule infectée et donc l'estimation de la parasitémie. A ce jour, la fiabilité et la sensibilité des examens microscopiques dépendent directement de l'expérience du microscopiste. Nous avons pu mettre en place une nouvelle stratégie pour le comptage automatique des globules rouges. Cette technique est robuste et devrait permettre d'aboutir à une estimation fiable de la parasitémie tel que développée dans nos travaux précédents.

#### Références

- [1] - OMS, rapport sur le paludisme dans le monde, (2014)  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf)
- [2] - Rapport UNICEF Côte d'Ivoire, (2006),  
[http://www.unicef.org/cotedivoire/french/health\\_nutrition.html](http://www.unicef.org/cotedivoire/french/health_nutrition.html)
- [3] - FATHALLAH AKILA, cours de collège des maladies infectieuses microbiologie – parasitologie principes des techniques utilisées dans le diagnostic biologique du paludisme, (mars 2012).
- [4] - O. K. BAGUI, J. T. ZOUEU, C. WÄHLBY, Automatic malaria diagnosis by the use of multispectral contrast imaging, journal of physical and chemical new, volume 75 (janvier 2015), p.86-98.
- [5] - M. BRYDEGAARD, GUAN Z. and S. SVANBERG. Broad-band multi-spectral microscope for imaging transmission spectroscopy employing an array of light-emitting diodes. American Journal of Physics, 77 (2009), 104.
- [6] - MERDASA, ABOMA; BRYDEGAARD, MIKKEL; SVANBERG, SUNE; ZOUEU, JEREMIE T (2013). Staining- free malaria diagnostics by multispectral and multimodality light-emitting-diode microscopy. Journal of biomedical optics, 18, (3), 036002: SPIE
- [7] - J. T. ZOUEU & S. G. T. ZAN , Trophozoite stage infected erythrocyte contents analysis by use of spectral imaging LED microscope, Journal of Microscopy, Vol. 245, Pt 1 2012, pp. 90–99.
- [8] - JEREMIE T. ZOUEU, GEORGES L. LOUM, T. CISSE HABA, MIKKEL BRYDEGAARD and HERVE MENAN, Optical Microscope based on Multispectral Imaging Applied to Plasmodium Diagnosis, Journal of Applied Sciences 8 (15) (2008) 2711-2717.
- [9] - VINCENT JALBY, Université de Limoges, M1 Management de l'Innovation - Analyse des données, 2015-2015 – III. Analyses en Composantes Principales Page 3.
- [10] - L. A. ZADEH, Fuzzy sets. Information and Control, vol. 8 (1965) 338–353.
- [11] - I. BLOCH, Traitement d'images, Paris, Lavoisier - Hermes Science Publications, 2003, chap. 3, p. 95–151.
- [12] - A. KAUFMANN, Introduction to the theory of fuzzy subsets. —Academic Press, New York, 1975.
- [13] - B. BOUCHON-MEUNIER, C. MARSALA (sous la direction de), Traitement de données complexes et commandes en logique floue. Lavoisier - Hermes Science Publications, Paris, 2003.
- [14] - S. MILAN, VACLAV HLAVAC and ROGER BOYLE, Digital Image Processing and computer Vision. 3<sup>rd</sup> Edn, Nelson Education Limited, Toronto, Canada, ISBN-13: 9780495082521, P.434.
- [15] - RIDLER and CALVARD'S, Kittler and Illingworth's and Otsu's methods for image thresholding, 33(6) : 793-797. 2012