

TP- Introduction à ImageJ

ImageJ est un logiciel libre de traitement et d'analyse d'images, développé par le NIH et implémenté par la communauté des scientifiques. Il fonctionne sous de multiples plates-formes (Windows, Mac, Linux, Unix,...). Il est disponible ainsi que toute la documentation associée à l'adresse suivante : <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
Les images pour les exercices sont disponibles à l'adresse [www.Silico.biotoul.fr/enseignement/L2 BCP/MABS/Automatisation Données Biologiques](http://www.Silico.biotoul.fr/enseignement/L2BCP/MABS/Automatisation%20Donn%C3%A9es%20Biologiques/)

Partie I : Outils et fonctions de base

Prise en main du Logiciel

A) Caractéristiques des images

- Ouvrir A4Dapi.tif . Noter les informations disponibles sur l'image (haut de la fenêtre : nombre de pixels, type d'images, taille de l'image dans la mémoire de l'ordinateur)
- Sélectionner la loupe dans la barre de menu, cliquer dans l'image : clic gauche = zoom interne, clic droit = zoom externe.
- Agrandissez l'image pour faire apparaître un indicateur rectangulaire indiquant que l'image est plus grande que la fenêtre et la position où vous vous situez dans l'image.
Cliquer sur la main dans la barre des menus. Revenez sur l'image, cliquez dans l'image et conservez le doigt sur la souris. Déplacer l'image, et refaites un zoom dans l'image.
- Agrandissez votre image au maximum, et positionnez votre souris sur un pixel grisé. Notez dans l'interface ImageJ, la position du pixel et la valeur de gris.

B) Les outils de sélection

- Dans la barre des menus, vérifiez que le rectangle de sélection est activé (cliquez dessus), et sélectionnez une partie de votre image en cliquant sur un point et déplaçant la souris. Dès que vous relâchez la souris, la sélection est établie. En re cliquant dessus, vous pouvez modifier sa position, et en cliquant sur les carres blancs étendre ou non votre cadre.
- Testez les autres outils de sélection (ovale, main levée...)
- Réalisez une sélection et utilisez la commande Crop (Image>Crop)
- Vous pouvez revenir à l'image initiale dans File >Revert (Ctrl+r)
- Refaites une sélection et lancez la commande Duplicate (Image>Duplicate). Qu'observez-vous ?

C) Les outils de mesure

La commande (Analyze>Measure), mesure l'image ou des parties sélectionnées de l'image si une sélection est établie. Avec la commande (Analyze>Set measurements), vous pouvez sélectionner ce que vous souhaitez mesurer [surface (area), périmètre objet (perimeter)...]. Les résultats de mesure sont fournis dans une table (Analyze>Measure)

- Avec l'outil main levée, sélectionnez un noyau et évaluez sa surface et ses gris. Refaites la même chose en sélectionnant plusieurs noyaux. Pensez à zoomer dans l'image pour faire une sélection précise.
- Dupliquer vos résultats depuis la table de résultats (File>Duplicate)
- Refaites une sélection de plusieurs noyaux et remarquez où les résultats sont présentés.
- Effacer l'ensemble de vos résultats (Results>Clear) et refaites une sélection de 3 noyaux. Dans Results>Summarize et Results>Distribution, observez les paramètres présentés [min, max distribution]

D) Les outils lignes

Testez les différents outils lignes : ligne droite, ligne segmentée...(cliquez sur le bouton droit de la souris) et l'outil angle par rapport à l'axe x.

- Estimer la distance entre 2 noyaux
- Estimer le diamètre d'un noyau
- Estimer le périmètre d'un noyau
- Estimer l'angle entre 3 noyaux

Vous noterez que les valeurs de distance sont données en pixels, il faudra donc calibrer l'image pour obtenir des valeurs « réelle » en centimètres ou micromètres de l'objet.

E) Les outils de comptage

L'outil étoile permet le comptage objet /objet, ou le comptage multiple.

- Sélectionnez 3 noyaux, puis faites une sélection dans l'arrière plan, puis continuez à compter les noyaux. Supprimer le comptage de l'arrière plan (alt clic). Que remarquez-vous dans la numérotation des objets ?
- Sauvegardez votre image avec les points de comptage. Fermez et réouvrez votre image, observez vous toujours les numéros, pouvez vous les modifier ?
- Regardez la table de résultats (Analyze>Measure), chaque point de sélection est identifié par ses coordonnées x/y.

Calibration d'une image

Les caractéristiques de l'image / de la sélection sont données jusqu'à présent en pixels. Il est nécessaire d'établir une corrélation entre taille réelle de /la sélection l'objet/et taille de pixel, avant toute modification de votre image (agrandissement, réduction, crop..) pour ensuite pouvoir présenter une barre d'échelle sur votre objet. C'est l'étape de calibration.

→ après un agrandissement de l'image le pixel « apparait » plus grand à l'écran mais il représente toujours la même taille pour l'objet :

$$\text{Largeur réelle de l'image/l'objet } (\mu\text{m}) = \text{nombre de pixels} \times \text{taille réelle du pixel } (\mu\text{m})$$

Ouvrir l'image Lignes : la flèche du haut a une longueur réelle de 7 cm, la flèche du bas de 7,5 cm

- Tracer un trait sur la première flèche avec l'outil trait
- Quelle est la longueur de ce trait en pixel ?
- Vous connaissez maintenant la taille réelle du pixel (cm), et pouvez l'utiliser pour calibrer votre image.
- Allez dans Images>Properties, choisissez le centimètre (cm) comme unité de longueur et rentrez vos valeurs en cm de hauteur et largeur de pixels. Validez
- Qu'observez-vous au niveau des caractéristiques de votre image (barre au dessus de l'image ?)

Modifications de l'image

A) Seuillage d'une image (Threshold) et sélection de zone d'intérêt (ROI= Region Of Interest)

Ouvrir l'image A4dapi1.TIF

- Dans Image>Adjust>Threshold, visualisez les différents canaux de TS. Modifiez-les.

Le ROI Manager est un outil qui permet de gérer les différentes sélections réalisées sur l'image.

- Revenir sur l'image initiale
- Allez dans Analyze>Tools>ROI Manager
- Sélectionnez un noyau, puis un deuxième. Qu'observez-vous dans ROI Manager ?
- Dans ROI Manager, cliquer sur Measure. Qu'observez-vous ?
- Évaluez le diamètre et le périmètre de vos noyaux sélectionnés, via ROI Manager

Vous pouvez sauvegarder dans un fichier tabulé (colonne, ligne, type fichier excel) vos différentes ROI

- Appliquer un TS à l'image de façon à séparer le fond de l'image des noyaux. (exemple : fond blanc, noyau noir)
- Analyze>Analyze particles. Qu'observez-vous dans Roi manager et sur l'image ?

C) Conversion de l'image

- Afficher l'histogramme de l'image Arabette (Analyze>Histogram)
- Convertissez l'image en 8-bit (Image>Type>8-bit)
- Multipliez l'intensité image par X2 (Process>Math), regardez le nouvel histogramme
- Affichez la Look Up Table (LUT , Image>Color>Show LUT), affichez les LUT (Image>Color>Edit LUT)
- Choisissez la LUT, Fire (Image>LookupTables>Fire). Affichez la nouvelle table. Que constatez-vous ?
- Revenez à l'image d'origine, notez que l'image initiale n'est pas modifiée !!

D) Application de filtres

- Convertissez l'image en niveau de gris en 8-bits (Image>Type>8-bit)
- **DUPLIQUER** l'image (Image>Duplicate)
- Ajouter du bruit Process>Noise>Add Specified Noise et Standard deviation=25
- Quel(s) filtre(s) diminu(ent) le mieux le bruit parmi : smooth, sharpen, find edges , gaussian, median, min, max dans *Process*. **APPLIQUER CHACUN DES FILTRES SUR UNE COPIE DE L'IMAGE BRUTEE POUR POUVOIR COMPARER.**
- Reouvrir l'image d'origine, notez que l'application d'un filtre modifie de façon irréversible l'image, il faut donc travailler sur une copie de l'image (duplicate)

Notions de Macros

Nous allons créer une macro qui permet d'enchaîner les opérations suivantes : ouverture de l'image A4 DAPI.tif, TS de l'image, sélection des noyaux apres TS, sauvegarde des résultats.

-Allez dans Plugins>Macros>Record

Dès cet instant toutes les opérations que vous allez réaliser seront prises en compte, après sauvegarde de cet enchainement de tache, votre macro sera créée

1. Ouvrez l'image A4 DAPI.tif. Observez la ligne de code dans la fenetre « Macro record »
2. Image>Adjust>Threshold : adaptez et appliquez votre TS. Observez la fenetre « Macro record »
3. Analyze>Analyze particles
4. ROI Manager>Measure : par défaut la surface de l'objet est évaluée
7. Enregistrez votre macro : dans la fenetre « Macro record » :Create > File> Save as> EssaiMacro

- Tester votre macro apres avoir ferme tous vos fichiers : Plugins>Macros>Runs> EssaiMacro

Partie II : Mise en application

Dans une unité de recherche, on s'intéresse i) au comportement foliaire d'*Arabidospis thaliana* suite à l'application d'herbicides (Image : Arabette-Traitement) ii) au comportement de racines de légumineuse (*Medicago truncatula*) suite à une attaque tellurique par un champignon (Image : *Medicago*-Champignon).

Dans les 2 cas les expériences sont menées en culture in vitro (plaques 96 puits pour arabette, boîte carrée de 12 cm pour *Medicago*)

Cas 1 : Arabette/ Herbicide (Image Arabette-Traitement)

L'objectif de l'expérience est d'identifier parmi un lot d'herbicide, un qui est efficace contre arabette et la dose à laquelle son activité est optimale.

L'efficacité de l'herbicide se traduit par une décoloration des parties aériennes environ 48h après traitement.

Le plan de la plaque est présenté ci-dessous

				Her1	Her2					Her3	Her4
				NT	NT					NT	NT
				NT	NT					NT	NT
				50	50					50	50
				75	75					75	75
				100	100					100	100

NT = non traité

Her1, Her2, Her3, Her4 = nom des différents herbicides

50, 75, 100 = doses appliquées en µg/ml

Exercice : avec ImageJ, trouver un moyen pour identifier via une analyse d'image quel est l'herbicide le plus efficace et la dose. Vous pourrez présenter les résultats sous forme graphique dans un tableur (Open Office). Image « Arabette-Traitement »

Quelle est la limitation de ce plan d'expérience ?

Cas 2 : *Medicago*/Champignon (Image *Medicago*-Champignon)

L'objectif de l'expérience est d'identifier des lignées de *Medicago truncatula* (collection de plusieurs milliers de lignées) qui sont résistantes à l'infection par le champignon.

Lorsque le champignon s'installe et que la maladie se développe, les racines présentent une coloration brune depuis l'apex de la racine vers le collet de la plante. Plus la plante est sensible plus le brunissement s'étendra dans la racine.

L'image vous présente 2 boîtes contenant chacune 5 plantes. La boîte de gauche sert de témoin car les plantes ne sont pas inoculées par le champignon (les racines sont blanches), la boîte de droite vous présente 5 plantes de la même lignée avec des symptômes de brunissement plus ou moins important.

Exercice : avec Image J, trouver un enchaînement de taches qui permettrait de quantifier la longueur de la racine infectée afin de pouvoir classer les différentes lignées en fonction de leur sensibilité au champignon.

Les résultats pourront être stockés dans un tableur.