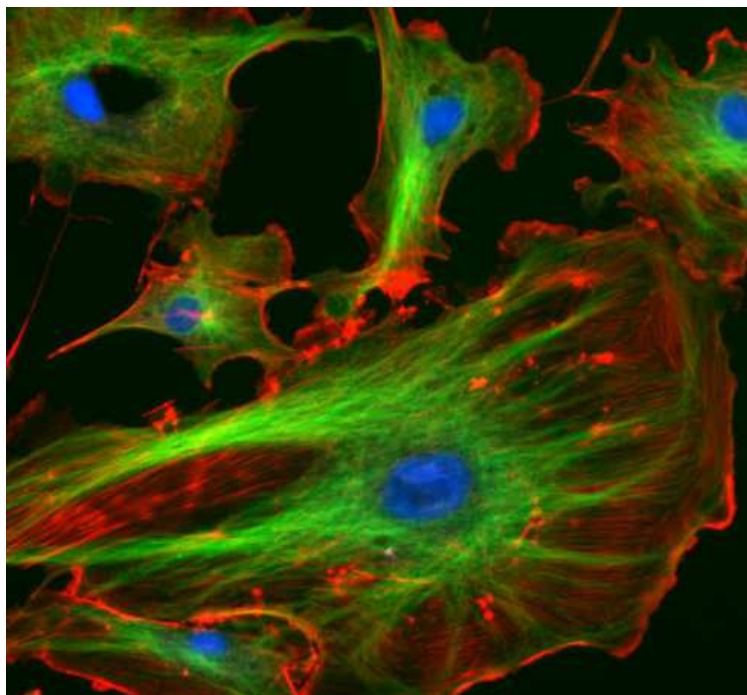




## *Manuel d'analyse d'images avec le logiciel ImageJ*



Sophie Allart et Astrid Canivet

[sophie.allart@inserm.fr](mailto:sophie.allart@inserm.fr)

[astrid.canivet@inserm.fr](mailto:astrid.canivet@inserm.fr)

Instituts  
thématiques



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

# Sommaire

Chapitre I : Qu'est ce qu'une image? .....	4
A- Introduction .....	4
B- Type, résolution, compression des images .....	4
a- Images matricielles (ou images bitmap).....	4
b- Images vectorielles.....	5
c- Résolution d'une image (dpi) .....	5
d- Dynamique de l'image.....	7
e- Représentation des couleurs .....	7
f- Images avec gestion de la transparence .....	8
g- Compression .....	8
C- Quelques précautions à prendre concernant les formats d'images: .....	10
D- Bien acquérir une image pour l'analyse d'images .....	10
E- L'analyse d'images: pourquoi faire? .....	10
Chapitre II: ImageJ: Présentation .....	12
A- Installation.....	12
B- Ouverture de fichiers .....	13
Chapitre III: Actions de base.....	15
A- Histogramme: Définition .....	15
B- Transformations d'histogramme:.....	15
a- Modifications linéaires:.....	16
b- Modifications non linéaires.....	18
Chapitre IV: Amélioration des images .....	20
A- Le bruit .....	20
B- Filtrage: Définition .....	20
C- Seuillage d'une image:.....	23
E- Options de binarisation.....	26
Chapitre V: Opération sur les images .....	28
A- Opérations mathématiques avec une constante.....	28
B- Opérations entre images .....	29
Chapitre VI: Quantifier des objets et des intensités dans une image .....	30
A- Calibrer l'image .....	30
B- Quantification d'intensité en 1D: le long d'un axe: .....	30
C- Quantification d'intensité en 2 D.....	31
D- Quantification d'intensité dans la profondeur d'une pile d'image .....	32
E- Comptage d'objets en 2D: Plugin Analyze particle .....	32
a- Segmentation et quantification d'objets sur une même image .....	32
b- Segmentation sur une même image et quantification sur une seconde image .....	34
Chapitre VII: La colocalisation .....	37
A - Définition de la colocalisation .....	37
B- Conditions pour étudier la colocalisation entre plusieurs molécules. ....	38
a- Choix de la technique d'acquisition .....	38
b- Elimination du « crosstalk » .....	38
c- Choix de l'objectif .....	39
d- Réglage du temps d'acquisition ou du gain. ....	40
e- Format d'image .....	40
C- Analyse de la colocalisation .....	40
a- Analyse qualitative .....	40

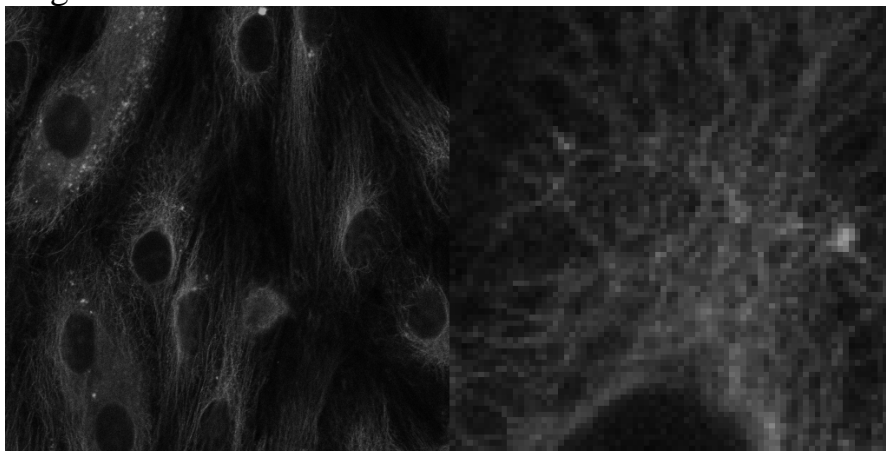
b- Analyse quantitative.....	41
3- Conclusion : .....	46
Chapitre VIII: Travailler avec des images 3D .....	47
A- Première étape : calibrer les distances .....	47
B- Les fonctions propres d'ImageJ .....	47
a- Orthogonal Views .....	47
b- Reslice .....	47
c- Générer la série complète des orthoslices: .....	48
d- Générer des coupes transversales suivant un axe/parcours particulier: .....	48
e- Z Project .....	48
f- 3D Project .....	49
C- Fonctions avancées de visualisation 3D : le greffon ImageJ 3D Viewer .....	50
D- Quantification en 3D .....	51
Chapitre IX: Montage de figures avec FigureJ .....	53

# Chapitre I : Qu'est ce qu'une image?

## A- Introduction

Une image numérique est une représentation bidimensionnelle discrétisée d'un espace continu.

En effet, elle est composée d'une matrice d'éléments que l'on appelle des pixels (PICture ELement) et qui correspondent en microscopie photonique à une valeur d'intensité de gris.



**Pixel:** (pour PICture ELement) est l'unité de base d'une image.

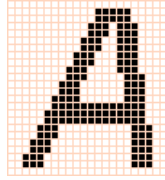
**Voxel:** (pour VOLumetric ELement) est l'équivalent 3D du pixel.

## B- Type, résolution, compression des images

On distingue deux types d'images à la composition et au comportement différent : **images matricielles** et les **images vectorielles**.

### **a- Images matricielles (ou images bitmap)**

Elle est composée comme son nom l'indique d'une matrice (tableau) de points à plusieurs dimensions, chaque dimension représentant une dimension spatiale (hauteur, largeur), ou autre (niveau de résolution). Dans le cas des images à deux dimensions, les points sont appelés *pixels*.



*Exemple d'image matricielle*

### **b- Images vectorielles**

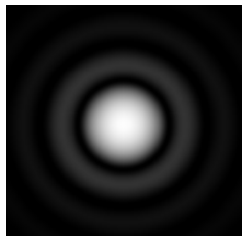
Elle est composée de différents objets repérés par leurs coordonnées et comportant différents attributs (bordure, fond, forme, coordonnées). Leur avantage c'est qu'elles peuvent être facilement redimensionnées. Leur codage dépend directement du logiciel qui a permis de les créer.

### **c- Résolution d'une image (dpi)**

La résolution d'une image est définie par un nombre de *pixels* par unité de longueur: Dot Per inch (ou dpi) par exemple. Plus ce nombre est élevé, plus la quantité d'information qui décrit cette structure est importante et plus la résolution est élevée. La résolution d'une image numérique définit le degré de détail de l'image. Ainsi, plus la résolution est élevée, meilleure est le rendu final. Augmenter la résolution peut entraîner des temps de visualisation et d'impression plus longs, et conduire à une taille trop importante du fichier contenant l'image et à de la place excessive occupée en mémoire.

**Résolution de l'objectif:** La résolution d'une image est la distance minimale à partir de laquelle deux objets peuvent être discriminés.

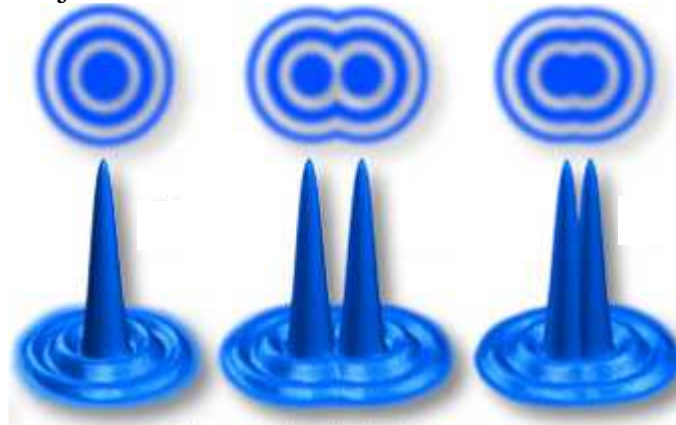
En optique, l'image d'un point n'est pas un point mais une tâche d'Airy due à la diffraction des rayons lumineux par le système optique.



*Tâche d'Airy*

La résolution du système est donc limitée par la diffraction et correspond à la distance entre deux objets pour laquelle le maximum d'intensité du disque

d'Airy du premier objet correspond au premier minimum d'intensité du disque d'Airy du second objet.



La résolution latérale théorique d'une image en microscopie confocale peut se calculer grâce à la formule suivante:

$$r = (0,4 * \lambda_{em}) / ON$$

avec  $\lambda_{em}$  la longueur d'onde d'émission et ON l'ouverture numérique de l'objectif. Avec un objectif 63X d'ouverture numérique 1,3, on obtient alors une résolution latérale théorique de 153 nm à une longueur d'onde d'émission de 500 nm.

Afin de réaliser les acquisitions dans des conditions optimales, le théorème de Nyquist préconise d'acquérir avec une fréquence d'échantillonnage de  $r/2.3$  soit ici un pixel de 66 nm. Ceci est particulièrement important lorsque l'on réalise une étude de colocalisation où il est nécessaire que le pixel soit le plus petit possible.

Attention: Cependant, il ne faut pas sur-échantillonner les images (c'est-à-dire avoir un pixel de taille inférieure à ce que préconise le théorème de Nyquist). En effet, dans ce cas, on ne gagne pas en résolution mais il va y avoir un phénomène d'aliasing (artefact="création d'un signal" qui n'existe pas en réalité)



*Exemple d'aliasing*

Plus il y a de pixels dans l'image, plus l'image va être longue à acquérir et donc plus votre échantillon va être illuminé (cela pouvant générer du photoblanchiment). De même, une image avec beaucoup de pixels sera plus volumineuse.

#### **d- Dynamique de l'image**

La dynamique de l'image est le nombre de bits associés à chaque couleur primaire d'un pixel. Cette valeur reflète le nombre de couleurs ou de niveaux de gris d'une image : 32 bits = 1,07 milliards de couleurs 24 bits = 16,7 millions de couleurs (ou couleurs vraies) 16 bits = 65 536 couleurs 8 bits = 256 couleurs 1 bit = 2 couleurs (noir et blanc).

En microscopie confocale, l'utilisateur peut choisir la dynamique de l'image à acquérir alors que le 12 bits est une dynamique classique des caméras CCD utilisées en microscopie.

L'œil humain n'est capable de distinguer que 50 à 60 niveaux de gris. Acquérir en 8 bits est donc souvent suffisant. Cependant, lorsque l'on souhaite analyser ses images, il est nécessaire de les acquérir en 12 bits car il y a ainsi beaucoup plus d'informations dans l'image en terme de niveaux de gris. Mais, une image acquise en 12 bits est plus volumineuse qu'une image acquise en 8 bits.

#### **e- Représentation des couleurs**

Il existe plusieurs modes de codage informatique des couleurs, le plus utilisé pour le maniement des images est l'espace colorimétrique Rouge, Vert, Bleu (RVB ou RGB). Cet espace est basé sur une synthèse additive des couleurs, c'est-à-dire que le mélange des trois composantes R, V, et B à leur valeur maximum donne du blanc, à l'instar de la lumière. Le mélange de ces trois couleurs à des proportions diverses permet quasiment de reproduire à l'écran toutes les couleurs du spectre visible, sans avoir à spécifier une multitude de fréquences lumineuses. Il existe d'autres modes de représentation des couleurs : Cyan, Magenta, Jaune, Noir (CMJN ou CMYK) utilisé principalement pour l'impression ; Teinte, Saturation, Luminance (TSL ou HSL), où la couleur est codée suivant le cercle des couleurs ; base de couleur optimale YUV, Y représentant la luminance, U et V deux chrominances orthogonales.

## **f- Images avec gestion de la transparence**

On peut attribuer à une image un canal supplémentaire, appelé canal alpha, qui définit le degré de transparence de l'image.

## **g- Compression**

La compression consiste à réduire l'espace occupé par un fichier en enlevant certaines données redondantes. Il existe deux types de compression : les compressions non destructrices (TIFF, RAW, etc.) et les compressions destructrices (JPEG, etc.). Les premières conservent toutes les informations du fichier image mais gardent en contrepartie un poids énorme (15Mo et au delà). Les secondes éliminent des informations considérées comme non primordiales, leur poids est nettement plus faible, ce qui explique l'utilisation de ces formats pour la mise en ligne sur Internet. En fonction de ces codages et de la compression des images, on obtient différents formats de fichiers :

Un format d'image est une représentation informatique de l'image, associée à des informations sur la façon dont l'image est codée et fournissant éventuellement des indications sur la manière de la décoder et de la manipuler. La plupart des formats sont composés d'un en-tête contenant des attributs (dimensions de l'image, type de codage, LUT, etc.), suivi des données (l'image proprement dite). La structuration des attributs et des données diffère pour chaque format d'image. De plus, les formats actuels intègrent souvent une zone de métadonnées (metadata en anglais) servant à préciser les informations concernant l'image comme : le nom du programme créateur, des annotations de l'utilisateur, etc ... Il existe plusieurs dizaines de formats s'appliquant aux images numériques. Nous aborderons les 2 principaux ici.

### **1- Le format Jpeg**

C'est le format d'images numériques le plus courant (extension **.jpg**). On le rencontre sur Internet. Il occupe peu d'espace disques. Cependant, la compression JPEG est destructive. Car elle est réalisée avec perte d'informations. Le JPEG profite de la faible sensibilité de notre œil aux variations de tons pour appauvrir les images sans que cela soit détectable. Les enregistrements successifs en JPEG provoquent des dégradations de l'image qui finissent par être perceptibles. L'enregistrement en JPEG doit donc être finale et dans un but de stockage définitif. En imagerie scientifique, la sauvegarde des fichiers en JPEG est à proscrire. Il est recommandé de toujours garder les fichiers sources afin de ne pas perdre d'informations (métadonnées+ image).



## **2- Le format TIFF (Tag Image File Format) (extension .TIF)**

C'est une image Bitmap très populaire dans l'édition. Le TIFF a été conçu au départ pour l'acquisition et la création d'images en vue de l'impression et est donc très souvent proposé comme format par défaut des logiciels de numérisation d'images (les fichiers stk de Metamorph ne sont que des piles de TIFF encapsulés). Il est indépendant de la plate-forme sur laquelle il a été créé et est compatible avec lui-même : une image TIFF peut être lue par n'importe quel logiciel qui supporte ce format (modulo la compression) et les différentes versions et révisions sont compatibles entre elles, un vieux logiciel est presque toujours capable de lire un TIFF récent. Ce format peut gérer quasi toutes les profondeurs de couleurs : niveaux de gris, 16, 24 ou 32 bits. Pour être visionné de la même façon sur des systèmes différents, il contient des informations sur le gamma. En fait ce format supporte ou non une compression sans perte de données du type LZW, Packbits, HUFFMAN, CCITT 3 et JPEG (la compression la plus utilisée est la compression LZW pour les images en couleur ; les formats CCITT 3 et HUFFMAN ne traitent que des images en noir et blanc). Le format TIFF est préférentiellement utilisé en mode non compressé car on s'assure de cette manière une compatibilité quasi universelle avec tous les logiciels d'imagerie et cela quelle que soit la plate-forme matérielle utilisée. Le format TIFF s'applique à tous les types d'images 2D (noir et blanc, niveaux de gris, palette de couleurs, couleur 24 bits) et supporte les images multiples comme les stacks Metamorph dans la limite de 4Go et est à l'heure actuelle le format le plus répandu et utilisé.

## **3- Le format constructeur**

Chaque constructeur possède son propre format d'images (.lsm ou .czi par exemple pour Zeiss, .lif pour Leica...) qui souvent ne peut pas être lu par les logiciels d'analyse des autres constructeurs. Cependant, il est très important de sauvegarder ses images en format constructeur car ces fichiers contiennent toutes les métadonnées relatives à l'acquisition des images (calibration spatiale et temporelle, paramètres d'acquisition...). ImageJ grâce au plugin Loci peut lire presque tous les formats et est aussi capable de lire les métadonnées codées dans le fichier et ainsi calibre automatiquement les images. Si les fichiers sont sauvegardés dans d'autres formats, ces métadonnées sont définitivement perdues.

## Tableau comparatif

	Type (matriciel/ vectoriel)	Compression des données	Nombre de couleurs supportées	Affichage progressif	Animation	Transparence
<b>JPEG</b>	matriciel	Oui, réglable (avec perte)	16 millions	Oui	Non	Non
<b>JPEG2000</b>	matriciel	Oui, avec ou sans perte	32 millions	Oui	Oui	Oui
<b>GIF</b>	matriciel	Oui, Sans perte	256 maxi (palette)	Oui	Oui	Oui
<b>PNG</b>	matriciel	Oui, sans perte	Palettisé (256 couleurs ou moins) ou 16 millions	Oui	Non	Oui (couche Alpha)
<b>TIFF</b>	matriciel	Compression ou pas avec ou sans pertes	de monochrome à 16 millions	Non	Non	Oui (couche Alpha)

### C- Quelques précautions à prendre concernant les formats d'images:

Les formats dits « propriétaires », peuvent différer selon le logiciel qui les manipule. De plus, leur pérennité n'est pas garantie : réaliser de nouveaux programmes pour les lire peut s'avérer difficile, cela peut même s'avérer illégal si les algorithmes utilisés sont protégés par des brevets. Il faut prêter attention aux différentes versions que peut recouvrir un format particulier. Notamment pour le format TIFF qui varie selon les versions ; certaines d'entre elles ne sont pas reconnues par certains logiciels.

### D- Bien acquérir une image pour l'analyse d'images

Avant toute chose, il est nécessaire de bien préparer ses échantillons pour la microscopie et de bien acquérir ses images. Un échantillon mal préparé ou une image mal acquise ne permettront pas d'obtenir de bons résultats.

Il est aussi important de toujours préparer des contrôles positifs et négatifs afin de s'assurer de la qualité des marquages.

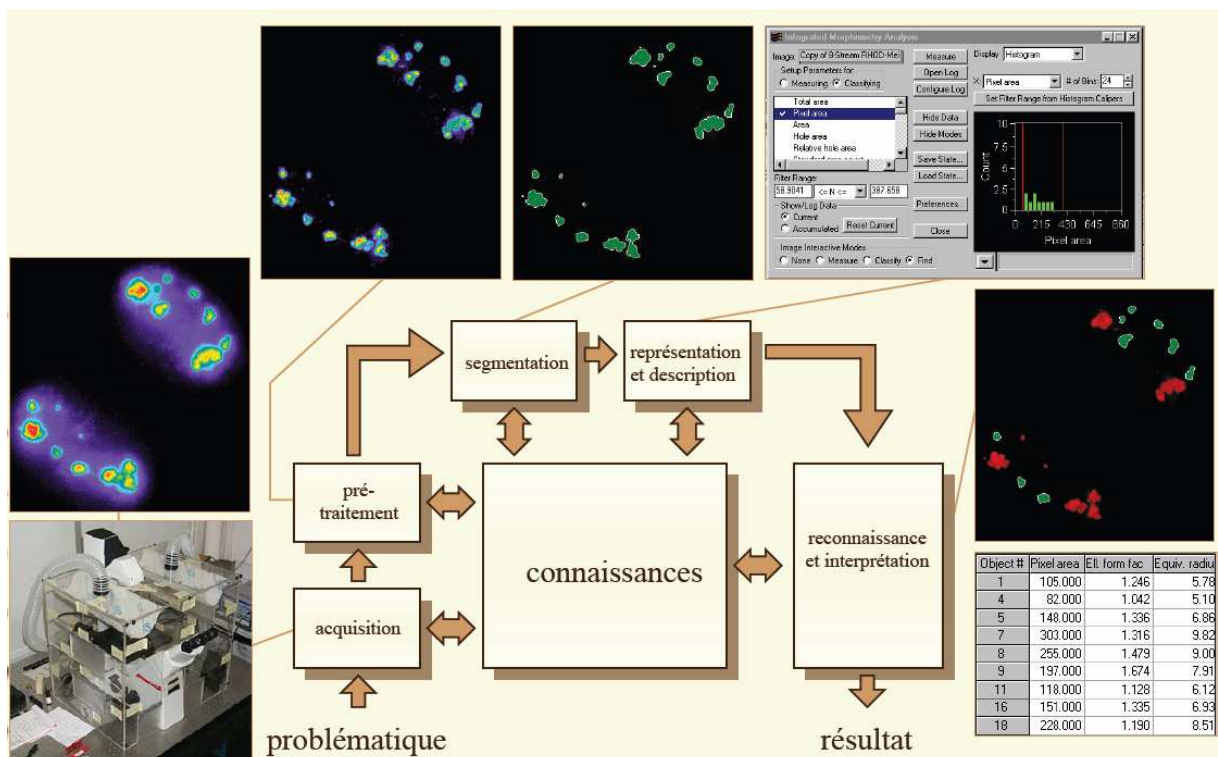
### E- L'analyse d'images: pourquoi faire?

Le but de l'analyse d'image est de fournir une description quantitative de l'image (nombre de cellules d'une certaine taille) ou une reconnaissance de forme (utile si les caractéristiques morphologiques de l'image sont liées aux

propriétés de l'objet). Elle trouve des applications dans de nombreux domaines : sciences des matériaux, sciences de la vie, géologie, robotique...

Une image «réelle» va être transformée en une image numérique par différents outils de transformation (caméra, scanner, satellite...). Cette image numérique est constituée de pixels contenant chacun différentes informations (intensité lumineuse, couleur...). Ces informations seront codées dans une grille échelonnée, le niveau de gris, de 0 à 255 par exemple. L'image obtenue après acquisition contient un nombre très élevé d'informations. Ces informations sont de plus imparfaites, car les conditions d'acquisitions ne sont jamais idéales (par exemple, défocalisation de la surface, défauts de symétrie d'éclairement, contraste insuffisant)... De plus, la richesse des informations est néfaste car souvent les informations apportées ne sont pas pertinentes : de nombreux détails de l'image concernent des objets que l'on ne veut pas prendre en considération. Il faudra donc simplifier l'image pour essayer de ne garder que les informations utiles à l'analyse. L'utilisation de filtres permet d'éliminer les effets indésirables et de «purifier» l'image.

Pour résumer, afin de pouvoir extraire des informations des images, plusieurs étapes consécutives sont nécessaires de l'acquisition jusqu'aux résultats finaux et ces étapes sont représentées dans le schéma ci-dessous :



# Chapitre II: ImageJ: Présentation

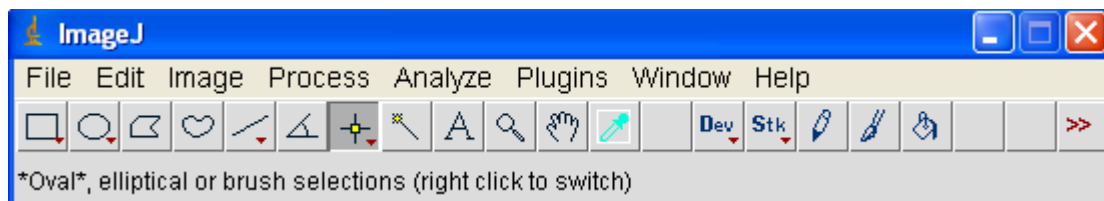
## A- Installation

ImageJ est un logiciel d'analyse d'images libre de droit développé par Wayne Rasband du National Institutes of Health. Il est téléchargeable gratuitement sur le site : <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html> où il faut choisir la plateforme utilisée et en 32 ou 64bits selon l'ordinateur utilisé. Si cela est possible, toujours préférer la version en 64 bits qui permet d'ouvrir des fichiers beaucoup plus lourds. Par défaut, ImageJ s'installe dans le dossier C:/Program Files/ImageJ/ Il est nécessaire de régulièrement mettre à jour ImageJ dans Help/ Update ImageJ afin de corriger d'éventuels bugs et d'ajouter de nouvelles fonctions.

Vous pouvez aussi installer de nouveaux plugins. Il peuvent être trouvés sur le site d'ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/index.html>) et sur les sites de développeurs en cherchant sur Google. Enregistrez ces plugins dans le dossier Program Files\ImageJ\plugins.

Re-démarrez ensuite ImageJ et votre plugin est automatiquement installé.

La fenêtre ImageJ contient une barre de menu standard, une barre d'outils et une barre d'état renseignant sur les coordonnées et les caractéristiques du pixel survolé par la souris et sur l'avancement des tâches en cours.

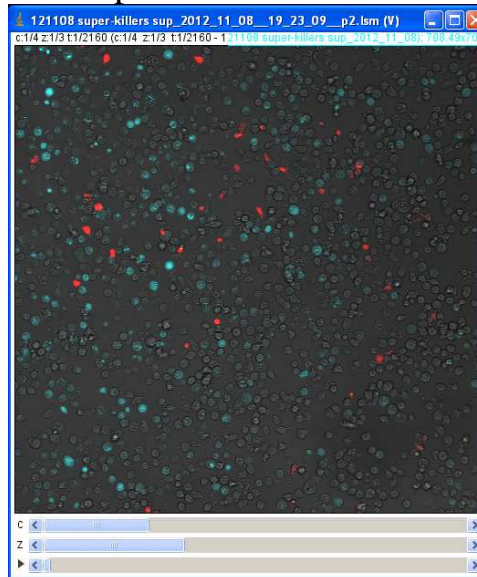


Il est possible de modifier la mémoire allouée à ImageJ afin d'ouvrir de gros fichiers dans Edit/ Options/ Memory & Threads. Cependant, elle est automatiquement ajustée au démarrage d'ImageJ et optimisée pour votre système. Changer manuellement la mémoire maximum à une valeur supérieur à 70% de la mémoire totale induira une lenteur d'exécution des tâches demandées.

**Stack:** Sous ImageJ, un stack est une image à 4 dimensions: x, y, c + z ou t.

**Hyperstack:** Sous imageJ, un hyperstack est une image à 5 dimensions ou plus : x,y,z,c,t. Il n'est pas simple de représenter ce type d'image compte tenu du nombre important de dimensions.

ImageJ offre la possibilité de manipuler facilement ce type d'images en plaçant sous l'image des barres de défilement qui permettent de sélectionner le canal "c", la tranche "z" et le point de temps "t" à afficher :



*Exemple d'hyperstack*

## **B- Ouverture de fichiers**

Pour pouvoir ouvrir vos images, il suffit d'aller dans File/Open ou de faire un glisser/déposer de votre image sur la barre d'imageJ.

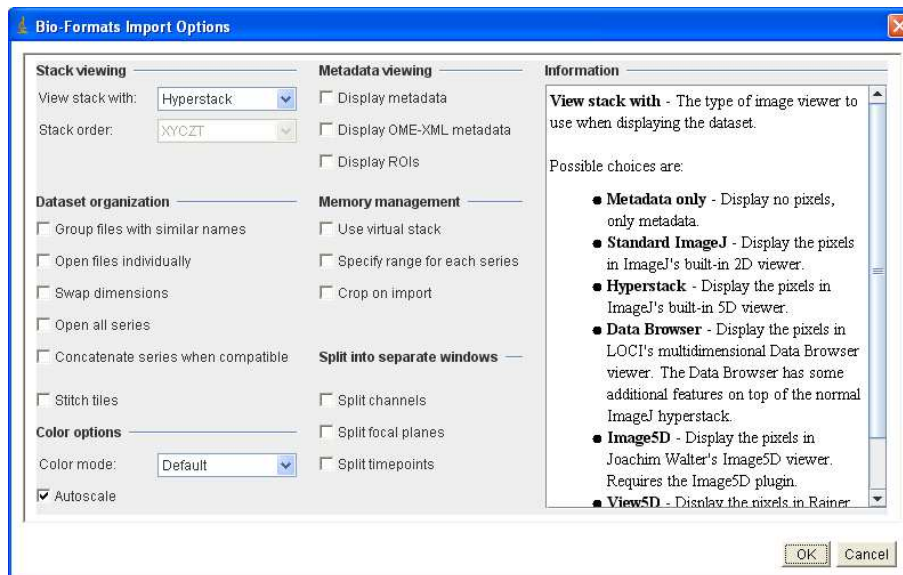
Pour pouvoir ouvrir vos images acquises en format constructeur de manière optimale, il vous faut utiliser le plugin Loci. Pour cela, téléchargez-le ([www.loci.wisc.edu/software/bio-formats](http://www.loci.wisc.edu/software/bio-formats)) et installez le dans le dossier Program Files\ImageJ\plugins .

Une fois re-démarré ImageJ, Loci se trouve dans le menu Plugin/ Bio Format Importer.

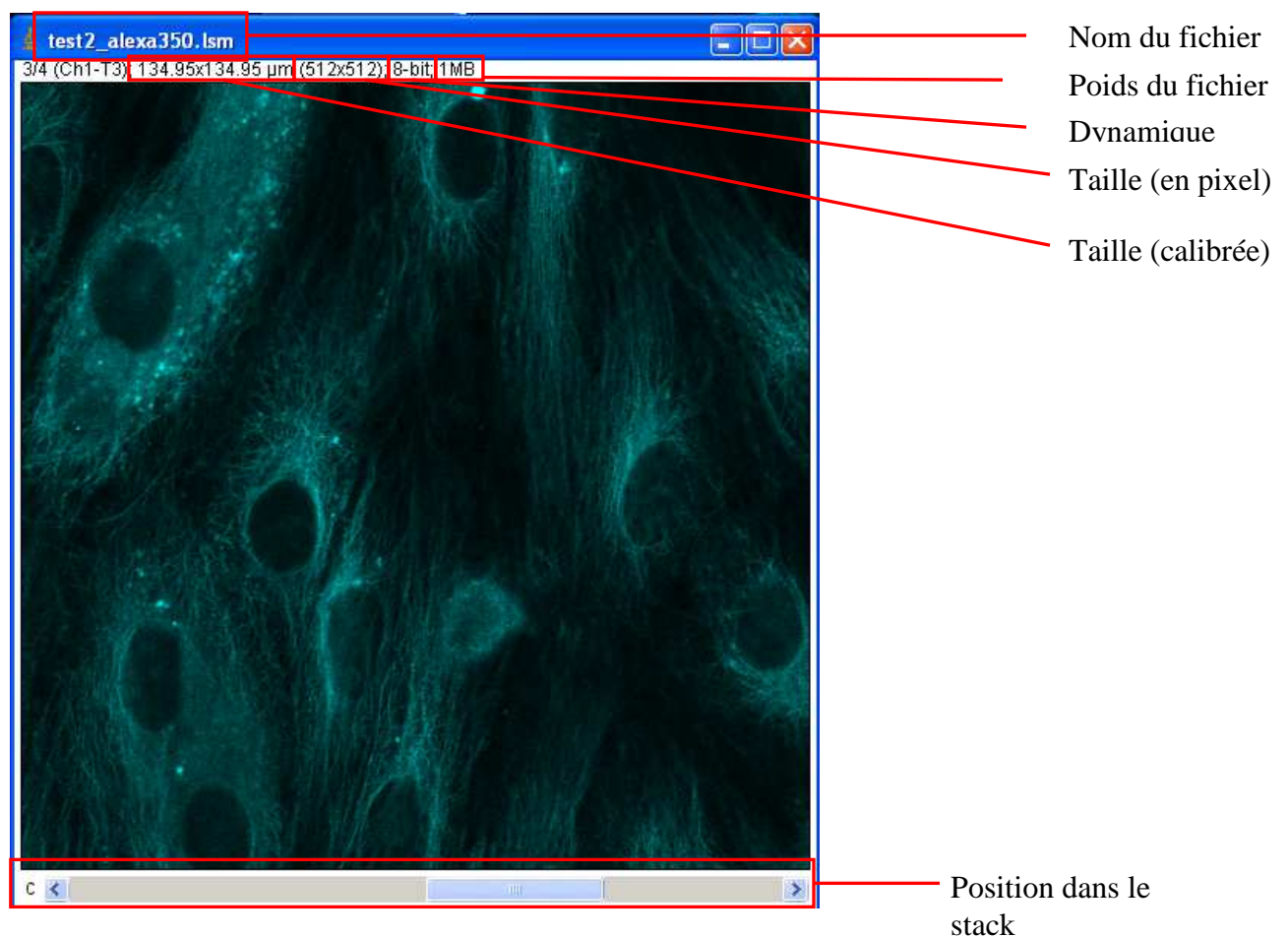
Vous pouvez alors choisir d'ouvrir vos fichiers selon différentes options:

- **Autoscale:** ajuste automatiquement l'affichage de l'image (brillance et contraste)
- **Display metadata:** pour afficher dans un fichier séparé les métadonnées de l'image
- **Display ROI:** ajoute les ROIs (Region Of Interest: Région d'intérêt) présentes dans l'image au ROI manager
- **Use virtual stack:** Permet de visualiser un fichier de taille supérieur à la mémoire disponible
- **Specify range for each series:** ouvre un sous ensemble du fichier selon les paramètres choisis.
- **Crop on import:** ouvre une partie de l'image selon les coordonnées choisies

- **Split channels:** les canaux sont ouverts dans des stacks séparés
- **Split focal planes:** les plan sont ouverts dans des stacks séparés
- **Split timepoints:** les temps sont ouverts dans des stacks séparés



Si l'image ouverte a été sauvegardée dans le format du logiciel d'acquisition, elle est alors automatiquement calibrée et le bandeau donne plusieurs informations:





## Chapitre III: Actions de base

**Modifier la taille** (en pixel) de l'image: Image/ Adjust/ Size. Attention: réduire la taille fait perdre des informations.

**Obtenir des métadonnées de l'image:** Image / Show Info (ou Ctrl+I) (sous réserve qu'elle est été enregistré sous le format du constructeur).

**Séparer les canaux d'une image:** Image/ Color/ Split channels

**Afficher une image avec les canaux superposés** s'ils sont ouverts dans des fichiers séparés: Image/ Color/ Merge Channels

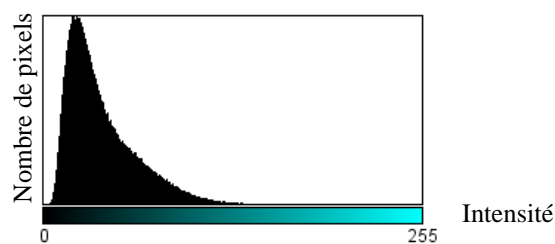
**Superposer des canaux d'un même stack:** Image/ Color/ Composite.

**Pivoter une image:** Image/ Transform

**Changer la couleur d'affichage de l'image:** Image/ Look up table (ne fonctionne pas avec des images RGB)

### A- Histogramme: Définition

L'histogramme d'une image est une fonction discrète qui représente la répartition du nombre de pixels dans une image en fonction de leur intensité. Un histogramme apporte des informations quantitatives mais ne contient aucune information spatiale.



*Exemple d'histogramme*

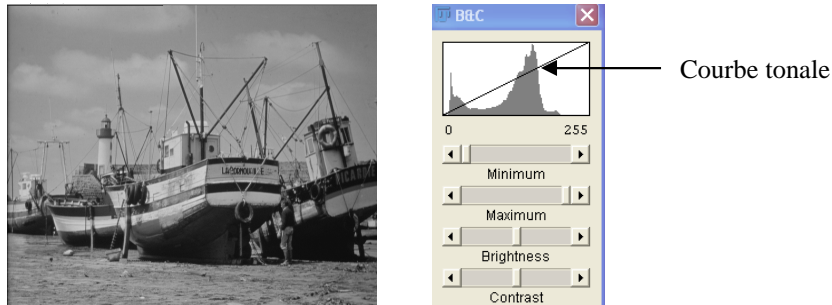
### B- Transformations d'histogramme:

Image/ Adjust/ Brightness Contrast

Des modifications peuvent être appliquées sur l'histogramme afin d'améliorer le contraste d'images sur ou sous-exposées. Ces modifications ne sont pas appliquées sur les données brutes et n'altèrent donc pas les informations contenues dans l'image. Elles changent seulement l'affichage de l'image pour permettre de mieux visualiser ces informations. Ces modifications peuvent être de différents types.

Sur l'image de l'histogramme est superposée une ligne (appelée courbe tonale ou Look Up Table -LUT) dont l'axe horizontal représente la gamme des tons d'une image avant correction (valeurs d'entrée) et l'axe vertical l'effet de ces corrections (valeurs de sortie).

La modification de la courbe déplace le point d'intersection de la verticale d'une valeur d'entrée donnée avec cette courbe. Une horizontale tirée à partir de ce point indique la nouvelle valeur de sortie.



*Image originale et courbe tonale correspondante*

Ici, la diagonale indique la courbe telle que les valeurs initiales sont égales aux valeurs finales, c'est-à-dire lorsque aucune modification n'a eu lieu.

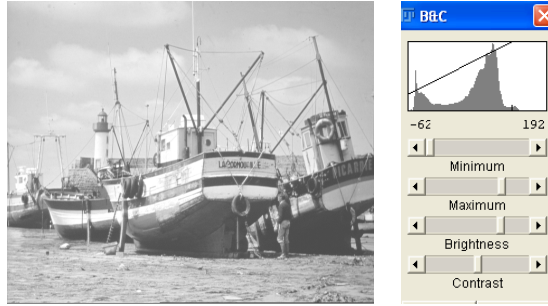
Par exemple, pour un pixel d'intensité  $i = 255$  dans l'image initiale, l'intensité  $f(i)$  de ce pixel dans l'image résultante correspond à la même valeur puisque l'équation de la courbe tonale dans ce cas est  $f(i) = i$ .

L'affichage d'une image peut être modifié en jouant simplement sur cette courbe afin de faire ressortir certains détails:

#### **a- Modifications linéaires:**

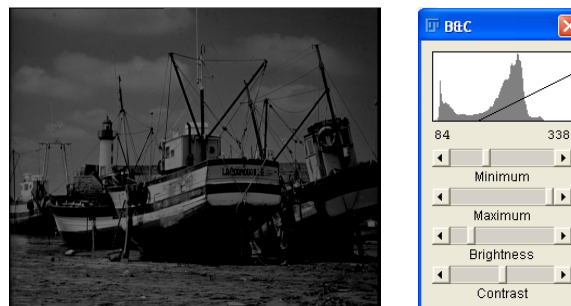
**1-L'éclaircissement ou l'assombrissement** sont créés par une simple translation parallèle de la courbe tonale de l'image originale. Du point de vue mathématique, la fonction serait exprimée par  $f(i) = i + b$  (avec  $b > 0$  pour un éclaircissement et  $b < 0$  pour un assombrissement). Cela peut être réalisée avec ImageJ grâce à la fonction Luminosité.





*Eclaircissement: image modifiée et courbe tonale correspondante*

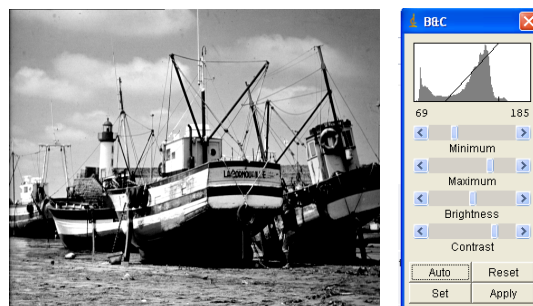
Ici, pour un pixel d'intensité  $i = 192$  dans l'image initiale, l'intensité  $f(i)$  de ce pixel dans l'image résultante est de 255.



*Assombrissement: image modifiée et courbe tonale correspondante*

Par exemple, pour un pixel d'intensité  $i = 84$  dans l'image initiale, l'intensité  $f(i)$  de ce pixel dans l'image résultante est de 0.

**2- La fonction Contrast** modifie la courbe tonale en maintenant inchangée l'intensité du point situé au milieu de la gamme (128 pour une image 8 bits, 32768 pour une image 16-bits) et en modifiant la pente de la droite de réponse.

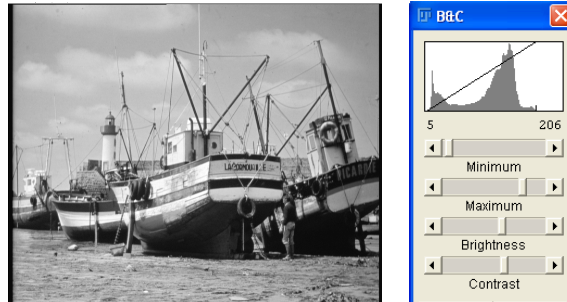


*Contraste: image modifiée et courbe tonale correspondante*

**3- La linéarisation ou étalement d'histogramme** consiste à répartir au mieux les intensités des pixels sur l'échelle des valeurs disponibles.

Ceci revient à étendre l'histogramme afin que la valeur d'intensité la plus faible soit à zéro et que la plus haute soit à la valeur maximale.

Ainsi, si les valeurs de l'histogramme sont très proches les unes des autres, l'étirement va permettre de fournir une meilleure répartition afin de rendre les pixels clairs encore plus clairs et les pixels foncés proches du noir et ainsi de distinguer plus facilement des pixels dont l'intensité est proche.



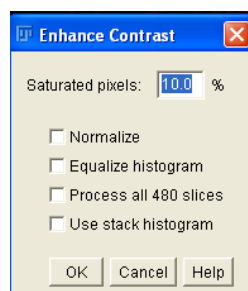
*Exemple de linéarisation*

**!Attention!** Cliquer sur Apply modifie l'histogramme de manière définitive!!

### **b- Modifications non linéaires**

Il est aussi possible d'afficher les niveaux de gris de manière différentielle. Par exemple, on peut vouloir donner un poids plus important aux classes fortement représentées. Bien étaler les niveaux, en fonction du poids de chaque classe s'appelle faire une égalisation d'histogramme. On trouve cette possibilité dans ImageJ avec Process/Enhance Contrast.

Cette fonction augmente le contraste en faisant un étirement ou une égalisation d'histogramme. Tant que *Normalize* et *Equalize Histogram* ne sont pas cochés, l'intensité des pixels n'est pas modifiée. *Saturated Pixels* détermine le nombre de pixels dans l'image qui peuvent être saturés. Augmenter cette valeur augmente le contraste. Comme il ne faut pas que des pixels soient saturés, il faut indiquer 0% dans Saturated Pixels.





*Image originale*



*Image avec contraste de 2%*

On peut aussi donner un poids différents aux pixels en fonction de leur intensité: par exemple en donnant des poids plus forts aux pixels de faible intensité ou au contraire à ceux de forte intensité; la courbe tonale résultante n'est plus alors linéaire.

Process/ Math/ Gamma

Les objets de faible intensité peuvent être rendus plus intense avec un gamma  $<1$ . Ceux d'intensité moyenne peuvent devenir plus faible sans diminuer l'intensité des objets brillants avec un gamma  $>1$ . Pour des images 8 bit, nouvelle intensité est alors égale à  $255 \times [(intensité\ initiale \div 255)^{gamma}]$

Ces opérations sont disponibles dans Process/Math/Gamma



*Gamma= 0.5*



*Image originale*



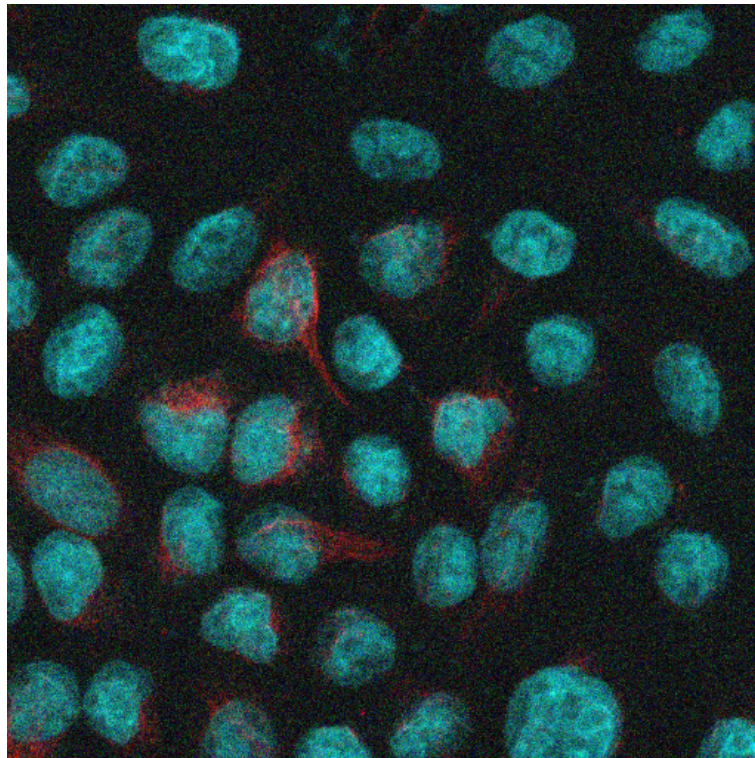
*Gamma=2*

**!Attention!** Afin de pouvoir comparer des images, il faut qu'elles soient acquises dans les mêmes conditions et que l'on applique les mêmes modifications linéaires et non linéaires sur l'histogramme.

# Chapitre IV: Amélioration des images

## A- Le bruit

Le bruit rassemble toutes les composantes qui s'ajoutent au signal de façon indésirable et qui diminue la qualité de l'image



*Exemple d'image bruitée*

Il existe trois types de bruit: le **bruit de photon** qui résulte des variations statistiques du nombre de photons incidents, le **bruit noir** issu des électrons générés par effet thermique même en absence de signal et le **bruit de lecture** généré par l'électronique du détecteur lors de la conversion du signal.

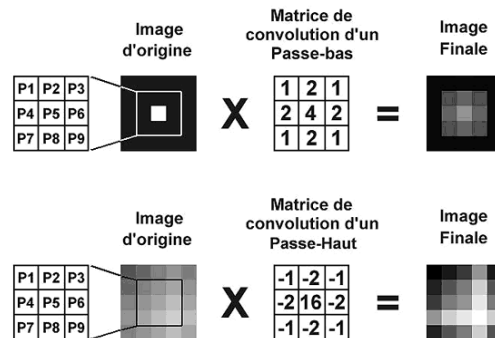
## B- Filtrage: Définition

Le filtrage consiste à modifier les valeurs des pixels en tenant compte de la valeur des pixels voisins grâce à un noyau appelé filtre de convolution.

Avec un filtre de convolution, la luminance d'un point est modifiée en fonction des luminances des points voisins. Pour cela, une matrice de valeurs correctives

ou noyau de taille  $n \times m$  est utilisée et est déplacée pixel à pixel sur l'image en faisant coïncider le centre de la matrice avec chaque point de l'image.

Quand tous les points de l'image ont été traités, on obtient alors l'image convoluée de l'image initiale. Cela permet de pré-traiter l'image avant la segmentation, par exemple en réduisant le bruit (on parle de lissage), en corrigeant une inhomogénéité de champs ou en mettant en avant les structures d'intérêt.



*Exemple de convolution*

**1- Le filtre moyen:** permet simplement de remplacer chaque valeur de pixel d'une image avec la valeur moyenne de ses voisins ainsi que la sienne. Il permet de réduire le bruit additif dans une image. La taille du noyau de convolution influe sur le degré de flou introduit dans l'image: plus il est grand, plus l'image finale sera floue.

Néanmoins, compte-tenu du flou qu'il introduit dans l'image, il engendre un adoucissement des zones de transition. D'autres filtres, comme le filtre médian peuvent être plus appropriés.



*Image originale*



*Image convoluée*

Exemple de filtre moyen:  $\times 1/9$

1	1	1
1	1	1
1	1	1

**2- Le filtre gaussien:** est similaire au filtre moyen mais il utilise un noyau qui représente le profil d'une gaussienne. Ce filtre produit un meilleur lissage et préserve mieux les contours qu'un filtre moyen.



*Image originale*



*Image convoluée*

Exemple de filtre gaussien:

$$\frac{1}{273}$$

1	4	7	4	1
4	16	26	16	4
7	26	41	26	7
4	16	26	16	4
1	4	7	4	1

**3- Le filtre smooth:** Ce filtre trouve d'abord les valeurs minimales et maximales de l'intensité des pixels entourant le pixel en question. Si l'intensité du pixel central est dans l'intervalle défini par la valeur minimale et maximale alors il conserve sa valeur. S'il est supérieur, il est alors égal au max et s'il est inférieur il est égal au min. Il est approprié pour enlever du bruit de type sel et poivre tout en préservant les contours.



*Image originale*



*Image convoluée*

**4- Le filtre Median:** le pixel est remplacé par la valeur médiane des pixels entourant le pixel en question. Cela retire le bruit et préserve les contours mieux qu'un simple filtre moyen.





*Image originale*



*Image convoluée*

**5- Les filtres Min/Max:** ce sont des cas particuliers car il ne s'agit plus d'un opérateur linéaire. Cela consiste à remplacer la valeur d'un pixel par le pixel voisin minimum ou le maximum de la matrice centrée en ce point.

**6- Le filtre Sobel:** détecte les changements rapide d'intensité grâce à deux noyaux qui détectent les contours verticaux et horizontaux (Process/Find Edges dans ImageJ).



*Image originale*

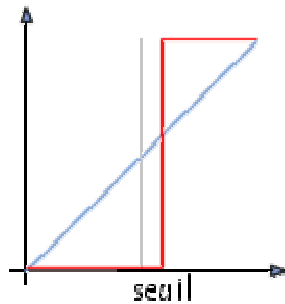


*Image convoluée*

### **C- Seuillage d'une image:**

Image/ Adjust/ Threshold

On binarise généralement une image pour faire apparaître certains détails ou tout simplement pour détacher du fond un objet. Cela consiste à transformer une image codée sur 8, 12 ou 16 bits, en une image binaire c'est-à-dire codée sur deux niveaux de gris: 1 (pixel blanc).



Tout le problème de la binarisation réside dans le choix optimal du seuil de binarisation. En effet, au-delà de ce seuil, les pixels seront considérés comme étant du signal d'intérêt et auront pour valeur 1; en deçà, les pixels seront considérés comme appartenant au fond et prendront pour valeur 0.



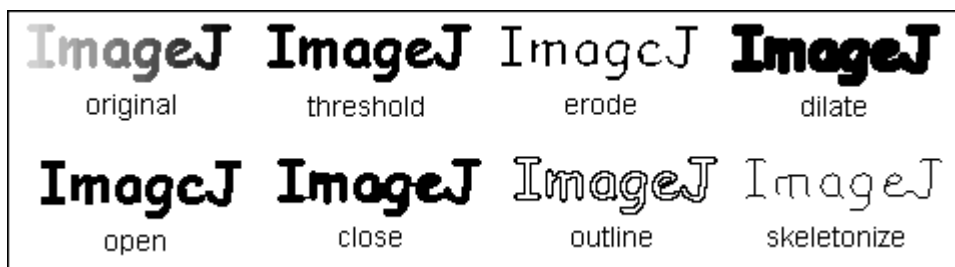
*Gauche: Image originale; Droite: Image seuillée*

Il existe différentes méthodes de seuillage et qui sont disponibles dans ImageJ. Cependant, il vaut mieux choisir soi-même la valeur du seuil afin de limiter les erreurs.

Le seuillage est souvent une étape préalable à l'analyse morphologique de l'image. Néanmoins, avant de pouvoir analyser les images, il faut d'abord corriger les erreurs issues du seuillage.

#### **D- Traitements sur images binarisées**

Les traitements suivants permettent de modifier l'image binaire à ces fins.





Les opérateurs sont particulièrement utiles pour l'analyse d'images binaires pour des opérations courantes de détection de contours, suppression de bruit, amélioration et segmentation d'images. Les opérateurs basiques sont : l'érosion et la dilatation. Ces deux opérateurs fonctionnent sur le même principe : l'image binaire est érodée ou dilatée par un élément structurant appelé kernel

### **- Erosion**

L'effet d'un tel opérateur sur une image binaire se traduit par un rétrécissement des surfaces des objets (diminution de la surface des pixels blancs); les ouvertures sont élargies.

Pour calculer l'érosion d'une image binaire par un élément structurant, il faut superposer le kernel avec l'image. Si au moins un pixel de l'image sous le kernel à une valeur = 0 et que le pixel cible est égal à un, alors la valeur du pixel cible dans l'image finale est égale à 0.

Attention, s'il existe des trous dans les objets, c'est à dire des "morceaux" de fond à l'intérieur des objets, ils seront accentués; les objets reliés entre eux vont être séparés et les objets dont la taille est inférieure à celle de l'élément structurant vont disparaître.

### **- Dilatation:**

L'effet de la dilatation sur une image binaire se traduit par un élargissement des surfaces des objets.

Lorsque le kernel détecte sous son pixel central un pixel dont la valeur est de 1, il scrute les 8 pixels voisins de la cible et si au moins un pixel appartient au fond (valeur = 0) alors, tous les pixels de l'image sous le kernel sont placés à la valeur 1.

Attention, s'il existe des trous dans les objets, c'est à dire des "morceaux" de fond à l'intérieur des objets, ils seront comblés; si des objets sont situés à une distance moins grande que la taille de l'élément structurant, ils vont fusionner.

Quelques propriétés :

- L'érosion et la dilatation ne sont pas inverses mais duales. La dilatation préserve la connexité si l'élément structurant est connexe. L'érosion ne préserve pas la connexité.
- Il est équivalent d'éroder  $n$  fois un objet par un élément structurant de taille unité et d'éroder une fois ce même objet par le même élément structurant de taille  $n$ . Cette propriété est très intéressante dans la mesure où elle permet de limiter le nombre d'éléments structurants en mémoire.

### **- Ouverture**

L'ouverture joue le rôle d'un filtrage. L'ouverture peut être définie simplement comme une opération d'érosion suivie d'une opération de dilatation en utilisant le même élément structurant. La transformation par ouverture préserve mieux les régions de contours en les adoucissant, supprime les petites îles et les caps étroits.

### **- Fermeture**

La fermeture opère d'une manière identique à l'opération d'ouverture à la différence près que l'ordre des opérations sont inversées : la dilatation précède l'érosion.

### **- Squelettisation**

L'opération de squelettisation est un processus pour réduire l'image binaire d'un objet à son ossature tout en conservant les connectivités de l'image d'origine.

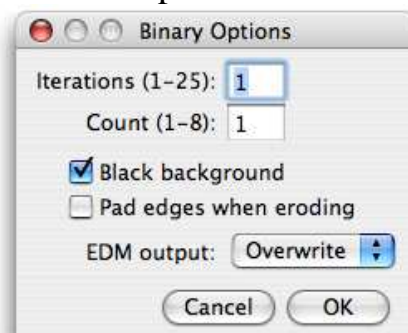
Le squelette peut être considéré comme étant l'ensemble des centres des cercles de diamètre maximal contenus dans l'objet. L'opération consiste à faire une érosion ultime du contour de l'objet par un élément structurant qui préserve les points de terminaison des segments du squelette.

### **- Watershed**

L'opération de ligne de partage des eaux permet de séparer automatiquement des particules qui se touchent. Tout d'abord, le point érodé ultime de chaque particule est calculé. Ensuite, ces points sont dilatés jusqu'à ce que le bord d'une autre particule soit atteinte. Le watershed fonctionne mieux sur des objets qui ne se superposent pas trop.

## **E- Options de binarisation**

Cette fenêtre permet de modifier les paramètres des actions de binarisation.



*Iterations* : pour spécifier le nom d'érosion, dilatation, ouverture ou fermeture réalisées.

*Count*: pour spécifier le nombre minimum de pixels adjacents faisant partis du fond requis avant érosion ou dilation.

Par exemple, si 3 est spécifié, il faut qu'il y ait autour d'un pixel X au moins 3 pixels faisant partis du fond (c'est-à-dire noir) pour que le pixel X soit érodé ou dilaté.

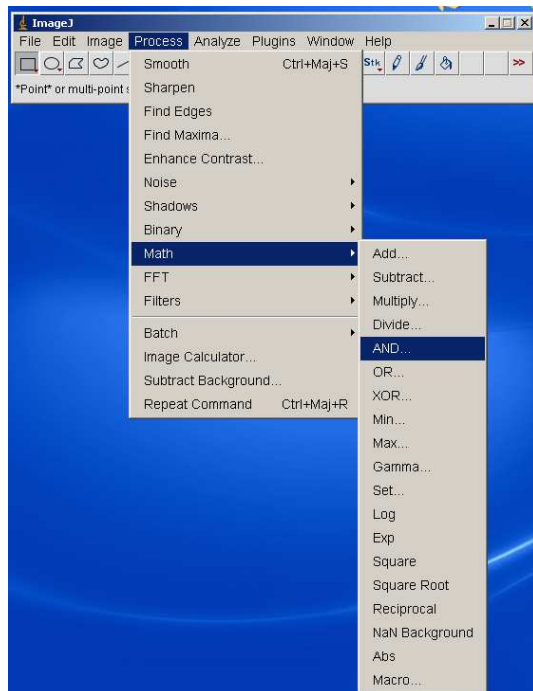
Si *Pad edges when eroding* est coché, *Process>Binary>Erode* n'érode pas à partir des bords de l'image. Cela affecte aussi *Process>Binary>Close*, qui érode à partir des bords à moins que cela soit coché.

*EDM output* détermine la dynamique de l'image en sortie.

# Chapitre V: Opération sur les images

## A- Opérations mathématiques avec une constante

Le menu **Process > Math** permet d'effectuer des opérations semblables à **Process > Image Calculator** mais avec des constantes. Voici le détail des fonctions :



**Add** : Ajoute une constante à l'image ou la sélection. Avec une image 8-bits, un résultat supérieur à 0 aura la valeur 255. Avec une image 16 bits la valeur maximale sera 65 535.

**Subtract** : Soustrait une constante à l'image ou la sélection. Avec une image 8-bits ou 16-bits la valeur minimale du résultat sera 0. Pour une Image 8-bits le résultat sera compris entre 0 et 255, pour une image 16-bits il sera compris entre 0 et 65 535.

**Divide** : Divise l'image ou la sélection par la constante spécifiée. Excepté pour les images 32-bits, une division par 0 sera ignorée. Avec une image 32-bits, une

division par 0 donnera soit NaN (Not a Number) ou Infini.

**Min** : Les pixels dont la valeur est plus petite que la constante spécifiée seront remplacés par cette constante.

**Max** : Les pixels dont la valeur est plus grande que la constante spécifiée seront remplacés par cette constante.

**Gamma** : Applique la fonction suivante  $f(p) = (p/255)^\gamma * 255$  à chaque pixel où  $0,1 \leq \gamma \leq 5,0$ . Pour les images couleurs cette fonction est appliquée à chaque canal R, G et B.

**Set** : Remplit la sélection ou l'image par la valeur spécifiée.

**Log** : Pour les images 8-bits, applique la fonction suivante  $f(p) = \log(p) * 255/\log(255)$  à chaque pixel de l'image ou de la sélection. Pour les images RGB, cette fonction est appliquée à chaque canal.

**Reciprocal** : Génère une image réciproque, uniquement pour les images 32-bits.

**Abs** : Génère une valeur absolue de l'image active ou de la sélection. Fonctionne uniquement avec les images 32-bits.

## B- Opérations entre images

### « Image calculator »

Pour soustraire le fond d'une image, faire ressortir des détails ou travailler les masques (images binaire) détaillé plus loin, les opérations arithmétiques entre images sont nécessaires.

Voici la liste des opérations arithmétiques de base :

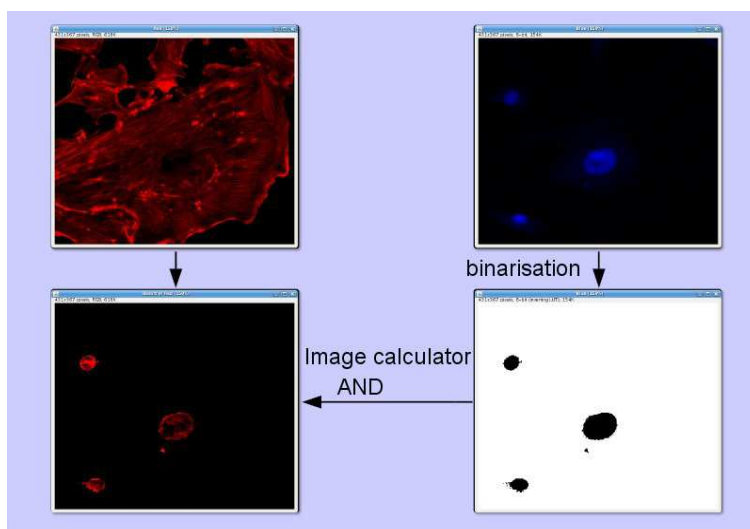
En blanc les pixels de valeur zero, en noir les pixels de valeur 255.

		Image1 :		Image2 :	
<b>Add</b>	$img1 = img1 + img2$		<b>XOR</b>	$img1 = img1 \text{ XOR } img2$	
<b>Subtract</b>	$img1 = img1 - img2$		<b>Min</b>	$img1 = \min (img1, img2)$	
<b>Multiply</b>	$img1 = img1 * img2$		<b>Max</b>	$img1 = \max (img1, img2)$	
<b>Divide</b>	$img1 = img1 / img2$		<b>Average</b>	$img1 = (img1 + img2) / 2$	
<b>AND</b>	$img1 = img1 \text{ AND } img2$		<b>Difference</b>	$img1 =  img1 - img2 $	
<b>OR</b>	$img1 = img1 \text{ OR } img2$		<b>Copy</b>	$img1 = img2$	

Exemple : calcul de l'intensité d'un fluorochrome dans des noyaux cellulaires : création d'un masque.

Tout d'abord, les noyaux (ici en bleu) sont sélectionnés par seuillage d'intensité, et un masque binaire est obtenu.

Ce masque est combiné à l'image du canal rouge par une opération AND dans l'onglet « process » « image calculator». Le résultat est une image où ne subsiste que le marquage dans les noyaux, que l'on peut quantifier.



# Chapitre VI: Quantifier des objets et des intensités dans une image

## A- Calibrer l'image

Afin de pouvoir faire des mesures dans les images (ou ajouter une barre d'échelle), il va falloir les calibrer spatialement. Cela peut être réalisé de deux manières différentes:

- Si on connaît déjà la taille d'un pixel, il suffit d'aller dans Image/ Properties et de compléter la boîte de dialogue.
- On ne connaît pas la taille du pixel mais on a sur l'image un objet de référence (noyau, micromètre-objet...), il suffit alors de tracer une droite sur cet objet et d'aller dans Analyze/ Set scale et de compléter la boîte de dialogue.

## B- Quantification d'intensité en 1D: le long d'un axe:

Tracer une ligne

Analyze/ Plot Profile (Ctrl+K)

Une nouvelle fenêtre apparaît constituée de l'image du profil qui peut être sauvée comme image via File/ Save as. Il y a aussi plusieurs boutons pour l'accès aux données numériques :

- List : affiche la liste des coordonnées des points constitutifs du profil : x, la position par rapport à l'origine de la sélection ; y, l'intensité du pixel.
- Save : sauve la table de résultats sous la forme d'une série de valeurs séparées par des tabulations. Cette option permet un réimport des valeurs dans un tableur.
- Copy : copie l'ensemble des coordonnées/valeurs vers le presse-papier. Il s'agit d'une autre solution pour réimporter les données vers un tableur.

Cette fonction d'ImageJ ne permet pas de traiter plusieurs couleurs simultanément. Pour cela, le plugin RGB Profiler sera utilisé. Il faut que l'image à analysée soit RGB et que les canaux d'intérêt soient en vert, rouge et/ bleu.

Il est possible de superposer le profile obtenu sur l'image analysée:

- Dupliquez l'image originale au moyen de la fonction Image/Duplicate.
- Réalisez la quantification pour obtenir le graphique.
- Le graphique apparaît en noir sur fond blanc, mieux vaut inverser le contraste pour obtenir un graphique tracé en blanc. Pour cela: Edit/invert.
- Copiez le contenu de la fenêtre de graphique et collez-le sur l'image de destination. Si l'on réalise un simple copier/coller, la portion de l'image située sous le graphique sera remplacée par le graph. Il fondre le graphique à l'image. L'option Edit/Paste Control permet de sélectionner la

méthode employée. L'option Transparent-zero permet de ne copier que les pixels non noirs ce qui nous intéresse.

- Copiez le graphique et collez-le sur l'image. La fenêtre de sélection en place sur l'image de destination peut être déplacée pour ajuster au mieux la position du graphique.
- Si le graphique est trop grand par rapport à l'image, redimensionnez l'image avant de la copier, au moyen de la fonction Edit/Size. La ligne du graphique apparaissant plus fine, on peut utiliser un peu de morphomathématiques pour l'épaissir: utiliser la fonction Process /Binary/Dilate.

### **C- Quantification d'intensité en 2 D**

- Déterminez dans Analyze/ Set Measurements les informations que vous souhaitez obtenir.
  - Area, Area fraction et Perimeter : aire, proportion de l'aire de la ROI par rapport à l'image et périmètre de la région. L'information est donnée en pixels/pixels<sup>2</sup> à moins que l'image n'ait été préalablement calibrée en distance avec la fonction Image/properties.
  - Mean/Modal/Min & Max Gray Value, Standard Deviation, Integrated density et Median : renvoie des statistiques sur les intensités des pixels de la zone d'intérêt.
  - Centroid et Center of mass : retourne les coordonnées respectives du centre géométrique et du centre d'intensité de la ROI.
  - Bounding Rectangle : caractéristiques du plus petit rectangle pouvant englober la ROI. Cette option renvoie les coordonnées du coin supérieur gauche du rectangle ainsi que sa largeur et sa hauteur.
  - Fit Ellipse : ajuste une ellipse sur la région d'intérêt et renvoie la longueur des deux axes de l'ellipse (majeur et mineur), ainsi que l'angle de l'axe majeur avec l'horizontale.
  - Shape Descriptors : calcule :
    - Circularité :  $(4\pi \times \text{aire})/(\text{périmètre})^2$ .
    - Aspect ratio : après ajustement d'ellipse, axe majeur/axe mineur.
    - Rondeur : après ajustement d'ellipse,  $(4 \times \text{aire})/(\pi \times \text{axe majeur}^2)$ .
    - Solidity : aire/aire de l'enveloppe convexe.
  - Diamètre de Feret : plus grande distance entre 2 points situés sur le périmètre de la région.
  - Kurtosis : caractérise la forme de la distribution des intensités de la ROI. Un kurtosis positif indique une distribution relativement pointue, un kurtosis négatif signale une distribution relativement aplatie.
  - Stack position : renvoie le numéro de la coupe sur laquelle est faite la mesure.

- Déterminez la région que vous souhaitez étudier:
  - Tracez une ROI. Vous pouvez l'enregistrer dans le ROI Manager afin de la ré-utiliser (Edit Selection/ Add to Manager)
  - Si la zone à quantifier se détache du fond environnant en terme d'intensité, on peut également réaliser un seuillage de l'image (Image/Adjust/Threshold). Il faut alors dans Set Measurement cocher le Limit to Threshold.
- Cliquez sur Measure pour avoir les informations souhaitées pour chaque ROI

### **D- Quantification d'intensité dans la profondeur d'une pile d'image**

Tracez une région fermée

Image / Stack / Plot z profile (donne un tableau de résultats ainsi qu'un graphique )

### **E- Comptage d'objets en 2D: Plugin Analyze particle**

#### **a- Segmentation et quantification d'objets sur une même image**

- Si besoin, soustraire le fond (Process / Subtract background). Plus le radius est petit, plus la soustraction sera importante
- Faites un seuillage (image/ Adjust/ Threshold), ne pas cliquer sur Apply.
- Dans Analyze/ Set measurements, choisissez quelles informations vous souhaitez obtenir.
- Lancez le plugin Analyze Particles (Analyze/ Analyze particles):

Ce plugin réalise une analyse en composantes connexes. En effet, chacun des pixels constitutifs des objets va se voir attribuer une étiquette. Le processus démarre avec le pixel en haut à gauche de l'image et se poursuit par la lecture des pixels ligne par ligne, de gauche à droite. Dès qu'un pixel objet est rencontré, les pixels adjacents (pixels touchants en arrière et en haut) sont consultés afin de savoir s'ils disposent déjà d'une étiquette. Si c'est le cas, cette étiquette est appliquée au pixel courant. Sinon, une nouvelle valeur d'étiquette lui est attribuée. Au final, un objet est donc constitué de l'ensemble des pixels porteurs d'une même étiquette.

Dans ce plugin, deux filtres sont ajustables afin de sélectionner les objets à étudier:

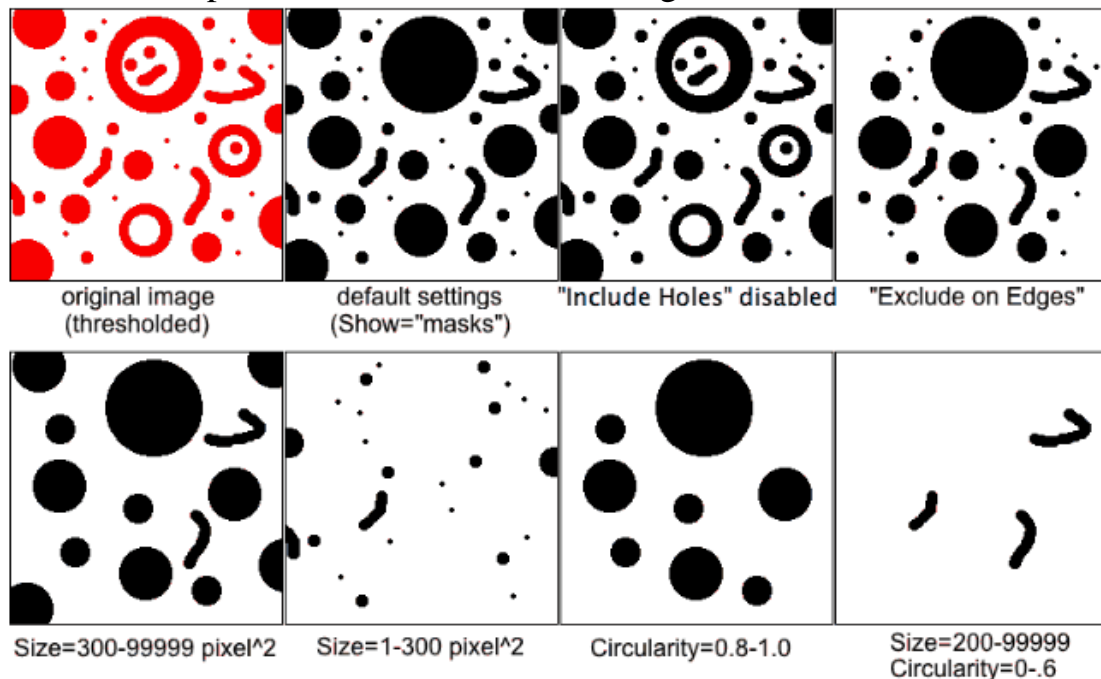
- La taille: afin de sélectionner des objets dont la taille est comprise dans la fourchette de taille mentionnée (en dehors de cette fourchette, les objets seront ignorés)
- La circularité: afin de sélectionner les objets en fonction de leur forme (0: pas circulaire, 1: cercle parfait). La formule utilisée est  $4\pi(\text{surface}/\text{périmètre}^2)$ .



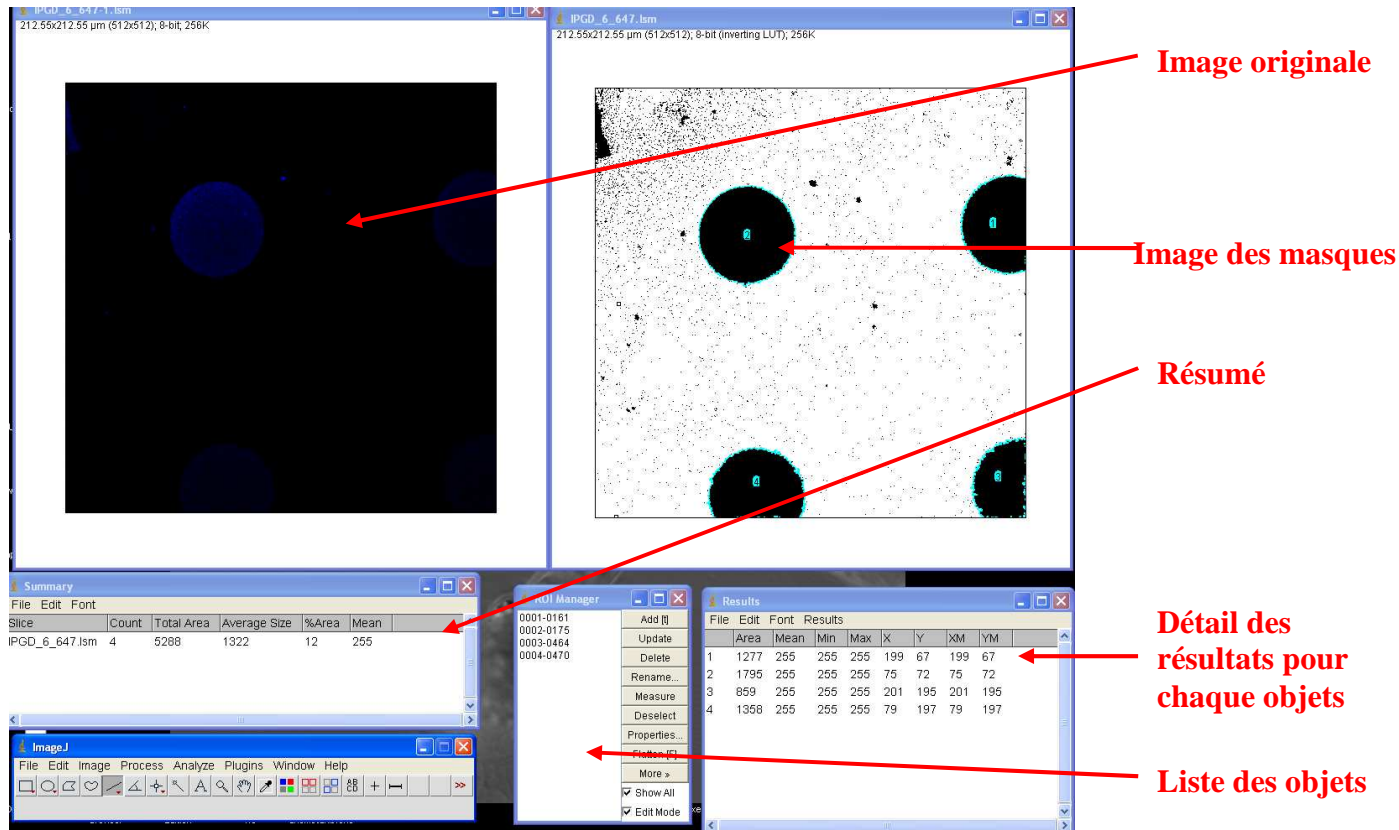
D'autres options sont sélectionnables:

- Show: pour choisir comment sont affichés les résultats (Outline: Carte des contours, Mask: Image binarisée, Ellipses: Affiche une image comportant des ellipses ajustées sur chacun des contours des objets, Count Masks: Carte étiquetée des objets )
- Display results: affiche les résultats objet par objet
- Clear results: efface les résultats de l'analyse précédente
- Add to manager: pour que les objets détectés soient enregistrées dans le ROI Manager
- Exclude on edge: exclue les objets qui touchent les bords
- Summarize: affiche dans une fenêtre séparée la moyenne des mesures sélectionnées dans Set measurements

Ces différentes options sont illustrées dans la figure suivante:



Voici un exemple de résultats obtenus grâce au plugin Analyze Particle:



## b- Segmentation sur une même image et quantification sur une seconde image

Cette technique peut être intéressante lorsque par exemple on veut quantifier le marquage nucléaire d'une protéine présente dans le noyau et le cytoplasme. Dans ce cas, la segmentation se réalise sur un marquage exclusivement nucléaire (par exemple le Dapi ) et la quantification sur le marquage d'intérêt.

Pour cela, il existe trois techniques différentes:

- Les objets détectés dans le canal DAPI sont enregistrés dans le ROI Manager et ensuite on mesure l'intensité dans ces ROI dans le second canal
- Dans Set Measurement on coche "Redirect to" et l'on choisit l'image de destination à analyser. On fait le seuil sur le DAPI et on lance le Analyse Particle

**!ATTENTION!:** Le "Redirect To" ne fonctionne pas avec la fonction Measure

- On réalise des masques entre l'image des noyaux et la seconde image avec la fonction AND. Cette méthode est la plus exacte car ainsi, les pixels issus du bruit de fond sont exclus.

## **Plugin Manual Tracking**

### Plugin/ Manual Tracking

Afin d'utiliser ce plugin, il est nécessaire d'avoir préalablement calibré spatialement et temporellement les images à étudier(1).

Cliquez sur *Add track* pour commencer un nouveau tracking (2) puis cliquez sur la structure à étudier dans votre stack. Il va alors automatiquement passer au temps suivant.

Une nouvelle fenêtre apparaît dans laquelle sont indiquées les coordonnées en xy, la distance parcourue dans l'intervalle de temps entre deux images ainsi que la vitesse.

Pour le premier point de chaque track, comme la distance et la vitesse ne peuvent pas être calculées, -1 est affiché à la place.

Si vous souhaitez effacer le dernier point, cliquez sur *Delete last point* (3).

Si vous souhaitez arrêter un track avant d'avoir atteint la fin de la pile d'image, cliquez sur *End track* (4).

Afin d'afficher le trajet de votre structure d'intérêt pendant que vous faites le tracking, cochez *Show path*.

Les résultats obtenus peuvent être affichés de plusieurs manières (5):

- Dots : génère une vue où des points sont placés sur les coordonnées en xy enregistrées. Il y a une couleur par track
- Progressive lines: une trajectoire progressive est affichée à partir des données xy enregistrées.
- Dots & lines: génère une vue superposée où une trajectoire progressive est affichée et des points sont placés sur les coordonnées en xy enregistrées
- Overlay dots: génère une vue superposée du stack et où des points sont placés sur les coordonnées en xy enregistrées.
- Overlay lines: génère une vue superposée du stack et où une trajectoire progressive est affichée à partir des données xy enregistrées.
- Overlay dots & lines: génère une vue superposée du stack et où une trajectoire progressive est affichée et des points sont placés sur les coordonnées en xy enregistrées
- Show text: le numéro du track est affiché

Il est possible de paramétrer l'affichage des résultats (taille des points, de la police et épaisseur du trait) (6).

**Tracking**

**Tracking :**

2

Add track

3

Delete last point

4

End track

Delete track n°

Delete all tracks

☐ Show path ?

**Centring Correction:**

Centring option :
 

Local maximum

☐ Use centring correction ?

**Directionality :**

Add reference

Delete reference

No reference set

☐ Show reference ?
 ☐ Use directionality ?

**Drawing .**

Dots

Progressive Lines

Dots & Lines

Overlay Dots

Overlay Lines

Overlay Dots & Lines

☐ Show text ?

Load Previous Track File

☒ Show parameters ?

Retrieve Z Coordinates

**Parameters :**

Time Interval :

2.0

sec

x/y calibration :

0.129

µm

z calibration :

0.3

Search square size for centring:

5.0

pixels

Dot size :

5.0

Line width :

1.0

Font size :

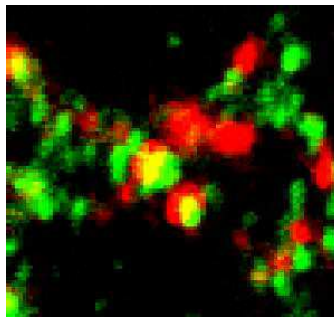
12.0

5

1

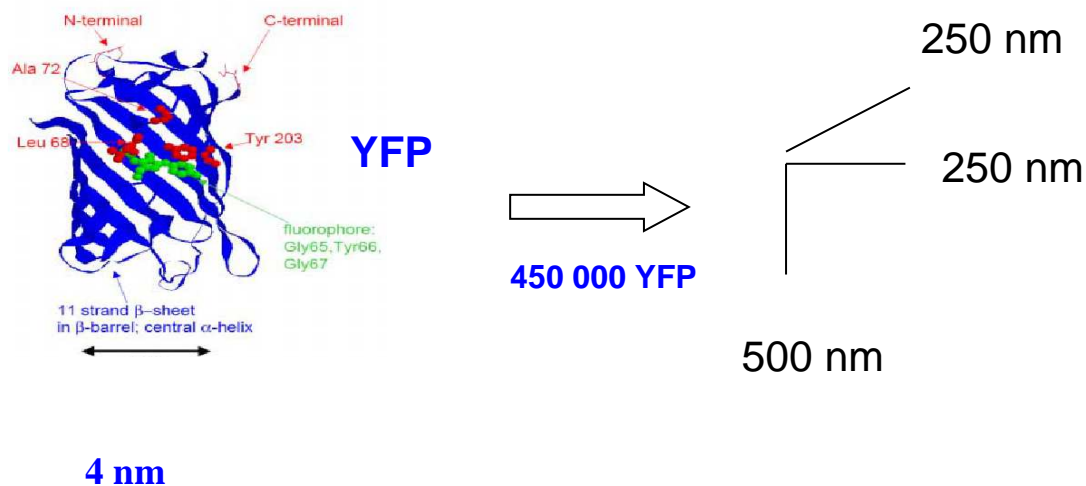
6

## Chapitre VII: La colocalisation



### A - Définition de la colocalisation

L'étude de la colocalisation consiste à rechercher, dans un espace donné en 3 dimensions, la présence concomitante de différents signaux fluorescents. La question souvent posée par les scientifiques est : "Est ce que mes deux fluorochromes sont situés dans la même structure physique (vésicules, cytosquelette, Golgi, RE....) ou bien dans des structures différentes ?" Pour répondre à cette question, il faut garder à l'esprit que la molécule a une taille de quelques nanomètres, alors que la résolution d'un microscope optique est de l'ordre de quelques centaines de nm.



*La taille des fluorochromes est de l'ordre de quelques nm alors que la résolution d'un microscope optique est proche du  $\mu\text{m}$ .*

Partant de ce constat physique, l'étude de la colocalisation en microscopie photonique permet d'affirmer que les molécules d'intérêt se trouvent dans le même voisinage, mais ne permet pas de conclure à une interaction entre les molécules.

## **B- Conditions pour étudier la colocalisation entre plusieurs molécules.**

### **a- Choix de la technique d'acquisition**

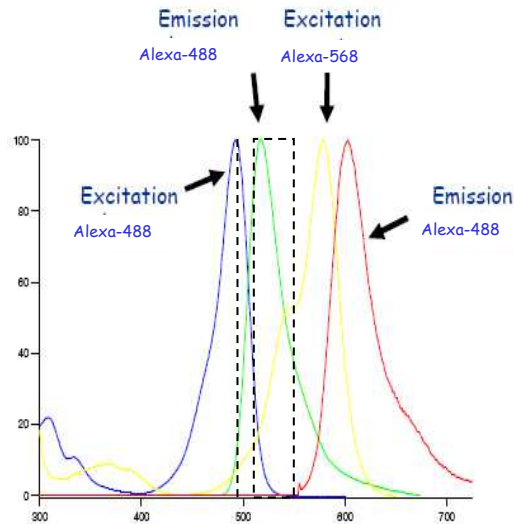
Comme vu précédemment, toute recherche de colocalisation doit être faite dans un espace à trois dimensions ( $x,y,z$ ). Pour cela, il faut prendre en compte l'information de la profondeur ( $z$ ) de l'espace. Par exemple une projection en  $z$  d'un stack d'image ne peut pas être utilisée car la composante de profondeur est perdue. En revanche, une section optique telle qu'une image acquise en microscopie confocale ou champ large après déconvolution peut être utilisée pour la colocalisation.

On évitera absolument de travailler à partir d'une image acquise en champ large sans déconvolution, car la fluorescence provenant de part et d'autre du plan focal introduit un biais dans l'étude de colocalisation. Celle-ci n'a alors plus de sens.

### **b- Elimination du « crosstalk »**

Il faut éviter impérativement le passage de la fluorescence émise d'un canal dans un autre, autrement appelé « crosstalk d'émission ». Ce phénomène introduit un biais dans l'étude de colocalisation, car elle donne un résultat de 100 % de recouvrement de pixels d'un canal avec l'autre. On peut l'éviter :

- en acquérant en mode séquentiel (excitation séquentielle, émission séquentielle)
- en choisissant des fluorophores dont les spectres sont éloignés (ex : Alexa Fluor-488 et cy-5), pour éviter les problèmes de recouvrement des spectres d'émission.
- en vérifiant l'absence de « passage » à partir des simples marquages acquis séparément.



*Les spectres d'excitation des fluorochromes tels que l'alexa-488 et l'Alexa 568 se recouvrent faiblement. En ajustant la bande passante de la fenêtre d'émission, on évite le passage*

### c- Choix de l'objectif .

Il est préférable de choisir un objectif :

- à forte ouverture numérique, afin de restreindre au maximum le volume d'étude de la colocalisation (voxel).

**Table 1.** The laws of Abbe and their effect on optical resolution and pixel sizes in wide-field and confocal microscopy.

	Wide-field		Confocal	
	Lateral resolution dx, y	Axial resolution dx, z	Lateral resolution dx, y	Axial resolution dx, z
Expression	$0.61 \lambda_{em}/NA$	$2 \lambda_{em}/NA^2$	$0.4 \lambda_{em}/NA$	$1.4 \lambda_{em}/NA^2$
Limit resolution of a 63×oil immersion objective with NA = 1.32 at $\lambda_{em} = 500$ nm	232 nm	574 nm	152 nm	402 nm
Minimal justified pixel size for this objective	101 nm	250 nm	66 nm	175 nm

NA, numerical aperture.

*D'apres S. Bolte et al., J. Microsc. 2006*

- corrigé pour les aberrations chromatiques, donc Apo-chromatique, car sinon les chemins optiques seront différents en fonction de la longueur d'onde. De plus, il faut vérifier cette correction avec des billes fluorescentes.

D'autre part, le signal doit être échantillonné selon le critère de Nyquist afin d'adapter la taille des pixels à la résolution de l'objectif.

#### **d- Réglage du temps d'acquisition ou du gain.**

Il est important de ne pas saturer le capteur, car l'intensité des pixels les plus intenses aura une valeur faussée (valeur maximale du capteur) et ne sera pas quantifiée correctement.

#### **e- Format d'image**

Il faut choisir un format d'image non compressé : pas de Jpeg (perte d'information à la compression), mais Tiff oui.

### **C- Analyse de la colocalisation**

#### **a- Analyse qualitative**

Quand on visualise la colocalisation, la méthode la plus simple est de présenter le résultat sous forme de la superposition des différents canaux, en général en utilisant un canal vert et un rouge. A noter que, dans le cas de deux canaux vert et rouge, la présence de couleur jaune dépend de l'intensité relative des signaux collectés dans les deux canaux. En effet, si les histogrammes d'intensité sont les mêmes pour chaque canal, alors le pixel superposé sera jaune. Dans le cas contraire, c'est-à-dire si la stoechiométrie des fluorochromes n'est pas égale à 1, le pixel sera plutôt orange ou plutôt vert, alors que la colocalisation est complète sur ce pixel.

En conclusion, si cette méthode est utile pour estimer la colocalisation de façon visuelle, elle peut conduire en revanche à de mauvaises interprétations.

Il existe différents types de colocalisation :

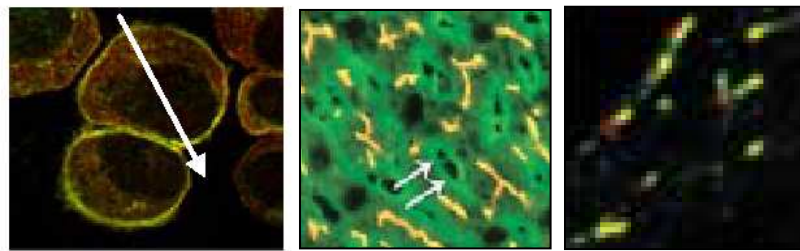
- La colocalisation complète : il y a recouvrement des signaux dans tous les cas.
- La colocalisation occasionnelle : les signaux ne se recouvrent pas de façon systématique, c'est-à-dire qu'il y a des zones de colocalisation complète et des zones d'exclusion.
- La colocalisation partielle : il y a chevauchement entre les signaux.
- L'exclusion : il n'y a pas de colocalisation



Complète

occasionnelle

Partielle



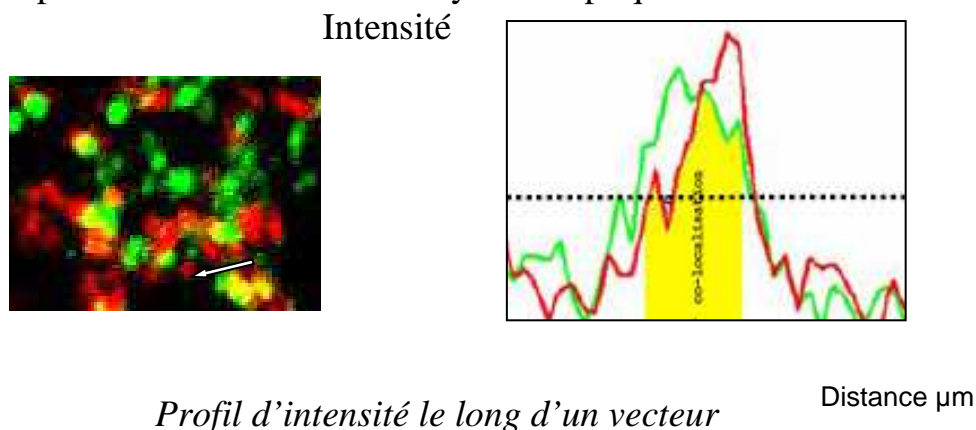
*Différents types de colocalisation*

## b- Analyse quantitative

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la méthode qualitative d'analyse de la colocalisation est utile pour une estimation rapide, mais elle peut conduire à des interprétations erronées. Pour évaluer de façon plus précise des événements de colocalisation, deux méthodes existent qui sont i) l'analyse basée sur les objets individuels et ii) une approche globale basée sur le calcul de coefficient de corrélation d'intensité.

### 1- Analyse basée sur les objets individuels

La première étape, uniquement valable pour des objets de taille proche ou supérieure à la résolution du système optique, consiste à dessiner un vecteur traversant la structure d'intérêt, et de « grapher » l'intensité de fluorescence de chaque couleur le long de ce vecteur. On estime que deux signaux colocalisent si la distance de chevauchement des profils d'intensité de fluorescence à mi-hauteur est supérieure à la résolution du système optique.



*Profil d'intensité le long d'un vecteur*

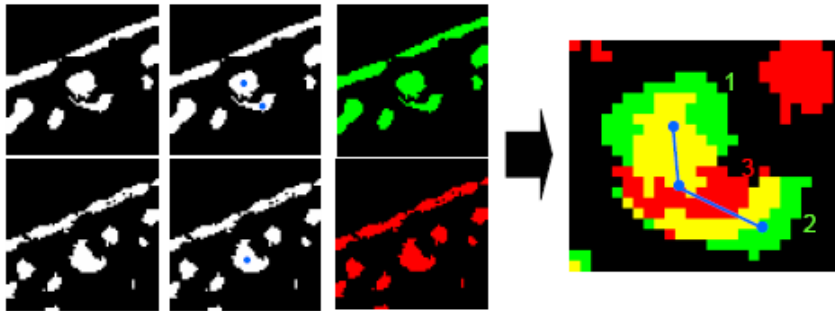
Même si elle est puissante pour estimer la colocalisation, cette méthode est restreinte à un nombre limité d'objets dans une image, ne marche que sur des

structures relativement isotropiques, et peut parfois conduire à une sous-estimation de la colocalisation.

La deuxième étape s'applique à tous les objets, même ceux de taille proche ou inférieure à la résolution du système optique. Elle est basée sur l'identification et la segmentation de tous les objets d'une image.

Les deux images de couleurs différentes sont tout d'abord seuillées pour séparer les objets, puis les centroïdes (centres géométriques) ou le centre d'intensité des objets sont déterminés (x, y, z). Les deux peuvent coïncider mais ce n'est pas obligatoire si la distribution de fluorescence est anisotrope.

On compare alors la position des centroïdes ou des centres d'intensité des deux canaux de couleur. On considère qu'il y a colocalisation si la distance entre les centroïdes est inférieure à la résolution du système optique.



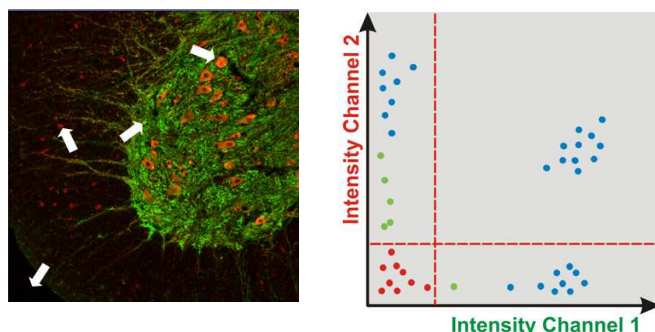
*Centroïdes de deux objets*

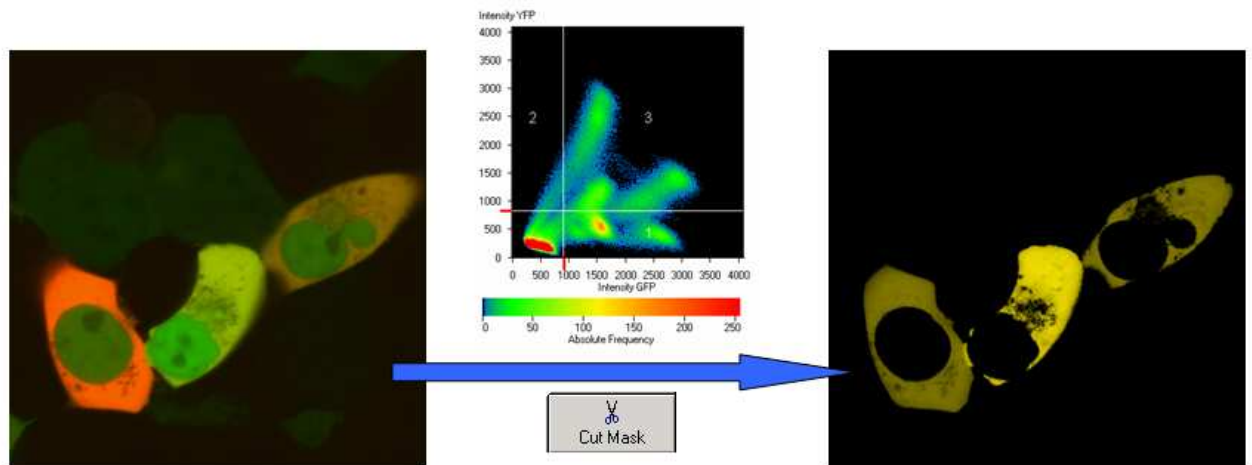
## 2- Analyse basée sur l'étude globale de corrélation d'intensité.

### Diagramme de corrélation

Aujourd'hui, presque tous les logiciels d'acquisition ou de traitement d'image permettent un type d'analyse globale, mettant en apparence le recouvrement des pixels, et donnant un pourcentage de recouvrement de signaux en partant d'un seuillage des canaux effectués par l'utilisateur ou de façon automatique. Cela consiste simplement à représenter l'intensité de fluorescence des pixels d'une image à deux canaux sur un diagramme appelé « cyto-fluorogramme » ou diagramme de corrélation.

*Diagramme de corrélation*





*Exemple de diagramme de corrélation : cellules transfectées GFP et DsRed.*













































### **Coefficients de colocalisation**

On peut alors calculer le coefficient de colocalisation pour chaque canal, qui est compris entre 0 et 1 :

$$\frac{\text{nombre de pixels qui colocalisent (cadrant 3)}}{\text{nombre de pixels total d'un canal (cadrant 3 + cadrant 1, ou 2)}}$$

On peut aussi calculer le coefficient de colocalisation pondéré par les intensités des pixels.

$$\frac{\text{Intensité des pixels qui colocalisent (cadrant 3)}}{\text{Intensité totale des pixels d'un canal (cadrant 3 + cadrant 1, ou 2)}}$$

	Vert	Rouge	Merge
Interprétation des valeurs obtenues :	 	   	   
Valeurs comprises entre 0 et 1	 	   	   
0 pas de colocalisation	 	   	   
0<coloc<1 colocalisation partielle	 	   	   
1 colocalisation complète	 		 

*Exemple de colocalisation partielle :*

*Cred = 0.5*

*Cgreen= 0.8*

*Il y a une plus grande proportion de pixels verts colocalisés que de pixels rouges*

On voit que ce type d'analyse basé sur le calcul du coefficient de colocalisation est dépendant du seuillage d'intensité dans chaque canal, ce qui introduit un biais. Pour éliminer ce problème, il existe des méthodes d'analyse basée sur l'intensité de tous les pixels d'une image, et donc indépendante du seuillage. Ces méthodes permettent le calcul de coefficients qui sont utilisés pour estimer la colocalisation. Il y a un grand nombre de coefficients dans la littérature, chacun ayant ses avantages et ses inconvénients. Voici une vue d'ensemble de ces coefficients.

### **Coefficient de Pearson :**

$$R_r = \frac{\sum_i (S1_i - S1_{aver}) \cdot (S2_i - S2_{aver})}{\sqrt{\sum_i (S1_i - S1_{aver})^2 \cdot \sum_i (S2_i - S2_{aver})^2}}$$

$S1_i$  : intensité du pixel du canal 1,  $S2_i$  intensité du pixel du canal 2

$S1_{aver}$  : intensité moyenne du canal 1,  $S2_{aver}$  : intensité moyenne du canal 2

$R_r$  est compris entre -1 et 1, il donne l'étendu de superposition entre deux images. Il correspond à la corrélation de distribution d'intensité entre canaux.

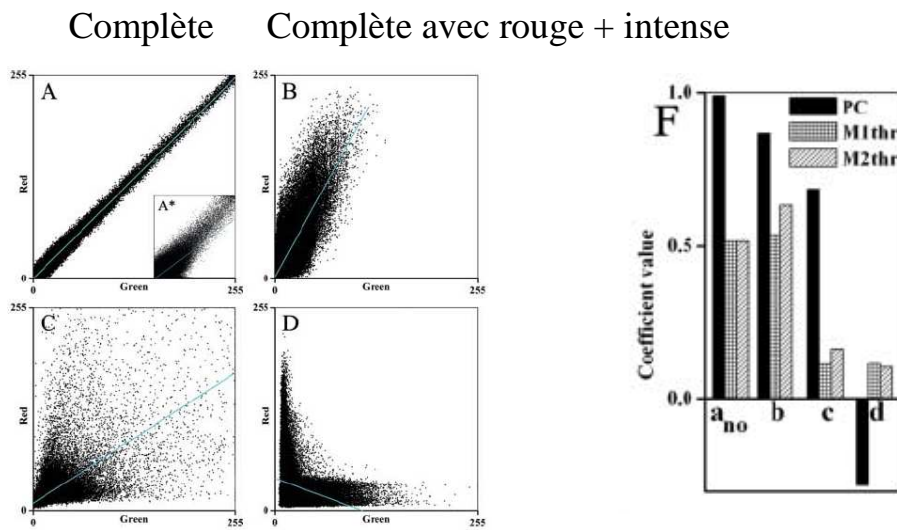
Le scatter plot combiné au calcul du coefficient de Pearson donne une première estimation de la colocalisation. Cependant, ce n'est pas suffisant pour une analyse rigoureuse, car c'est un coefficient sensible au bruit de fond, qui fait rarement la discrimination entre colocalisation partielle et exclusion. De ce fait, les valeurs entre -0.5 et 0.5 ne doivent pas être prises en compte.

## Coefficient de Manders

$$R = \frac{\sum_i S1_i \cdot S2_i}{\sqrt{\sum_i (S1_i)^2 \cdot \sum_i (S2_i)^2}}$$

Il est basé sur le coefficient de Pearson, mais les intensités moyennes ont été enlevées de la formule mathématique.

R est compris entre 0 et 1. Il est de 0 si les images ne se recouvrent pas, et de 1 si les images se recouvrent à 100%. Comme le coefficient de Pearson, il est sensible au bruit et au fond, et ne permet pas de faire la différence entre colocalisation partielle et exclusion.



Partielle      Exclusion  
*Coefficients de Manders et Pearson en fonction des types de colocalisation*

## Fonction de corrélation croisée (test statistique)

On génère ce type de test statistique pour vérifier que la corrélation observée n'est pas due à un positionnement aléatoire des pixels dans les deux canaux.

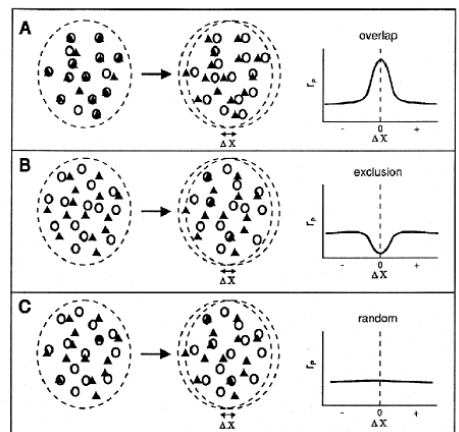
Il existe différents types de test statistiques, tous basés sur le coefficient de Pearson.

**Costes** : 200 images aléatoires sont créées et testées avec le coefficient de Pearson.

La corrélation observée est considérée comme significative comparée aux corrélations obtenues par génération aléatoire d'une des 2 images, si le  $R_r$  obs reste supérieur dans 95 % des cas aux  $R_r$  (rand).

**Van Steensel** : un paramètre de déplacement  $dx$  est créée et le coefficient de Pearson est alors calculé.

Quand la valeur  $R_r$  est fonction d'un paramètre de déplacement  $dx$  de l'image, on obtient une fonction de corrélation croisée (cross correlation function ou CCF). Le coefficient de Van Steensel est très valable pour les petites structures isotropiques



*Illustration du coefficient de van steensel.*

### 3- Conclusion :

Pour analyser la colocalisation de deux signaux fluorescents en microscopie optique, de manière générale, il faut multiplier les tests statistiques.

Dans le cas d'une colocalisation complète et sans bruit, l'utilisation du Scatter plot combiné au coefficient de Pearson et Manders suffit. Cependant plusieurs images doivent être traitées pour obtenir un résultat significatif.

Dans les autres cas (colocalisation complète avec bruit, colocalisation partielle, exclusion), les résultats seront confirmés par un test de Costes. Le coefficient de Van Steensel est très utile pour de petites structures isotropiques.

Enfin, des analyses basées sur des objets viendront amplifier généralement la conclusion obtenue par les tests précédents. Toutefois ces tests sont incontournables en cas de colocalisation partielle.

Enfin, et pour conclure, il faut toujours garder à l'esprit que la microscopie à fluorescence est seulement une étape dans l'étude de la colocalisation entre deux protéines, et doit être confirmée par des méthodes biochimiques ou si possible, par microscopie électronique.

## Chapitre VIII: Travailler avec des images 3D

### **A- Première étape : calibrer les distances**

Afin de pouvoir respecter les proportions d'affichage du volume en 3D, il nous faut faire le lien entre un nombre de pixels et une distance, il faut pouvoir indiquer au logiciel quel est l'équivalence entre la taille d'un pixel et sa correspondance en unités physiques. L'entrée de menu Image/Propriétés permet d'entrer la taille d'un pixel en x, y et la distance entre deux coupes optiques successives.

- Sous Unit of Length entrer l'unité de mesure de distance : micromètres, nanomètres...
- Sous Pixel Width/Height entrer la largeur et la hauteur d'un pixel en unités physique. En microscopie, les deux valeurs sont égales.
- Sous Voxel Depth, entrer la distance physique entre deux coupes optiques successives.
- En cochant la case Global, on peut appliquer la calibration courante à l'ensemble des images qui seront ouvertes pendant la session courante d'ImageJ. En microscopie plein-champ, on calcule la taille du pixel à partir des facteurs de grossissement et de la taille physique d'un pixel sur le capteur comme suit :  
$$\text{Taille du pixel image} = \frac{\text{Taille du pixel sur le capteur} \times \text{Binning}}{\text{Grossissement objectif} \times \text{Grossissements intermédiaires (optovar etc...)}}$$

### **B- Les fonctions propres d'ImageJ**

#### **a- Orthogonal Views**

La fonction Image/Stacks/Orthogonal Views permet de naviguer de manière interactive au sein du volume 3D. Elle génère deux vues dans la profondeur de la pile d'image, suivant deux axes orthogonaux. En maintenant le bouton gauche de la souris appuyé et déplaçant le curseur sur la pile d'image, l'utilisateur peut déplacer le point d'intersection des deux axes, mettant à jour les 2 vues en coupe. Il suffit de fermer l'une des deux coupes orthogonales pour quitter le mode Orthogonal Views.

#### **b- Reslice**

La fonction que nous venons de voir est principalement un outil de visualisation. Utile, elle est cependant contrainte par l'orientation des deux axes, ne générant que des vues orthogonales. De plus, elle ne permet de n'obtenir que deux images en sortie. Si l'utilisateur souhaite utiliser une orientation particulière du plan de coupe, ou générer une série de tranches parallèles à l'axe qu'il aura défini, il faut utiliser un autre outil : Reslice.

### **c- Générer la série complète des orthoslices:**

Nous allons voir la procédure permettant d'obtenir une série de coupes transversales à partir d'une pile d'image.

1. Ouvrir la pile d'images sur laquelle le processus doit être appliqué.
2. Calibrer l'image en distances
3. Lancer la fonction Image/Stacks/Reslice : l'interface apparaît.
4. Utiliser l'interface, afin de déterminer les paramètres suivants :
  - Slice Spacing : Rappel de la distance physique séparant deux coupes successives. Si l'image a bien été calibrée, ne pas changer la valeur.
  - Start At : Définit le point de départ de la génération des coupes orthogonales : haut, bas, droite ou gauche.
  - FlipVertically : Renvoie le résultat sous la forme d'une image en miroir suivant la verticale.
  - Rotate 90 Degrees : Applique une rotation de 90° vers la gauche à l'image résultat.
  - Avoid Interpolation (use 1.0 for spacing) : A cocher pour ne pas prendre en compte la disparité des dimensions x, y/z : inutile en microscopie optique.
5. Cliquer sur Ok pour générer le résultat. Il se présente sous la forme d'une pile d'images contenant l'ensemble des coupes orthogonales, ordonnées comme définit sous Start At.

### **d- Générer des coupes transversales suivant un axe/parcours particulier:**

Nous allons voir la procédure permettant d'obtenir une coupe ou une série de coupes à partir d'une pile d'image, suivant un axe/parcours défini par l'utilisateur.

1. Ouvrir la pile d'images sur laquelle le processus doit être appliqué.
2. Calibrer l'image en distances
3. Placer une région d'intérêt de type ligne, série de segments ou sélection à main levée sur l'image.
4. Lancer la fonction Image/Stacks/Reslice : l'interface apparaît. Dans le cas d'une sélection de type ligne segmentée ou sélection à main levée, l'interface est identique à celle présentée précédemment. Si la sélection est une ligne, un paramètre supplémentaire est accessible: le Slice Count. Ce paramètre permet de définir le nombre de coupes transversales, parallèles à générer. Les coupes seront générées en direction du bas et de la droite de l'image.
5. Cliquer sur Ok pour générer le résultat. Il se présente sous la forme d'une image ou d'une pile d'images contenant la/les coupes suivant l'orientation définie par l'utilisateur

### **e- Z Project**



Les deux fonctions précédentes permettent de présenter sous un angle différent une pile d'image habituellement parcourue coupe à coupe. Une autre forme de représentation consiste à générer une vue 2D à partir de l'ensemble de l'information contenue dans le volume : il s'agit des projections, la plus couramment utilisée étant réalisée suivant la profondeur de l'image (axe z). La fonction Image/Stacks/Z Project permet de générer ce type de vues :

1. Ouvrir la pile d'images sur laquelle faire la projection.
2. Lancer la fonction Image/Stacks/Z Project
3. Régler les options de la fenêtre :

Start/Stop Slice : indique les coupes de départ et d'arrivée à utiliser pour la projection. Permet de restreindre la projection à un sous-volume.

Projection Type : mode de création de l'image destination (projection). Un rayon est lancé sur la pile d'image, suivant un axe orthogonal aux plans de coupe. Le long de l'axe, l'intensité maximale, minimale, moyenne, médiane, la déviation standard ou la somme des intensités rencontrées est retenue pour servir d'intensité au pixel courant sur l'image destination. L'opération est répétée pour tous les pixels de l'image résultat.

#### **f- 3D Project**

La fonction Z Project permet de générer une projection dont l'axe est orthogonal aux plans de coupes. Si l'on souhaite générer une ou plusieurs vues obliques, dont l'angle est défini par l'utilisateur, il faut avoir recours à une autre fonctionnalité : 3D Project. Nous allons voir la procédure permettant de générer l'ensemble de ces vues autour de la pile d'images :

1. Ouvrir une pile d'images.
2. Calibrer la pile d'images en distance. Cette étape est essentielle pour que la série de représentations ait un aspect en volume conforme.
3. Lancer la fonction Images/Stacks/3D Project. L'interface apparaît.
4. Dans l'interface, on dispose des options suivantes :

Projection Method : la méthode de projection, qui définit le mode de détermination de l'intensité du pixel sur la projection, doit être choisie parmi les options suivantes :

Brightest Point : un rayon est lancé sur la pile d'image, suivant l'axe et sous l'angle défini plus bas. Le long de l'axe, l'intensité maximale rencontrée est retenue pour servir d'intensité au pixel courant sur l'image destination. L'opération est répétée pour tous les pixels de l'image résultat.

Mean Value : même cas de figure que précédemment, mais c'est l'intensité moyenne qui sera utilisée pour bâtir l'image destination.

Nearest Point : les deux méthodes précédentes reposent uniquement sur l'intensité et non sur la distance de l'observateur à l'objet. La projection Nearest Point génère une vue en retenant la valeur du premier pixel rencontré dont

l'intensité est comprise dans la gamme définie sous Lower/Upper transparency Bound.

Axis of Rotation : permet de sélectionner l'axe de rotation. Cet axe passe par le centre de l'image, est parallèle à l'un des bords de l'image et peut adopter les 3 dimensions de l'espace. En pratique, on utilise principalement les axes x et y. Une projection suivant l'axe z, pour des images de microscopie, revient à réaliser des rotations successives de l'image.

Slice Spacing : distance physique entre deux coupes optiques successives. Cette valeur est un rappel de la valeur entrée sous Image/Properties.

Initial Angle, Total Rotation, Rotation Angle Increment : permet de définir l'angle initial de rotation, la rotation totale et le pas entre 2 vues successives, respectivement.

Lower Transparency Bound, Upper Transparency Bound : définit les paramètres de transparence. Seules les valeurs comprises dans l'intervalle des valeurs entrées seront prises en compte pour la reconstruction. Ces paramètres permettent notamment d'éliminer des pixels d'intensité extrême hors objet d'intérêt (bruit de fond, points chauds etc...).

Opacity : définit la valeur de pondération permettant de combiner une des deux méthodes de projection, Brightest Point ou Mean Value, avec la méthode Nearest Point". Entrer une valeur différente de zéro pour utiliser cette fonctionnalité.

Surface Depth-Cueing, Inferior Depth-Cueing : ces deux paramètres permettent de pondérer l'intensité du pixel sur l'image destination en fonction de la distance à l'observateur. Surface Depth-Cueing fonctionne avec la projection de type Nearest Point" et une opacité de zéro, Inferior Depth-Cueing avec les deux autres types de projections. Les deux paramètres permettent de définir le poids des pixels de premier et d'arrière plans. Une valeur de zéro pour l'un et ou l'autre des paramètres annule cet effet.

Interpolate : à cocher dans le cas où les voxels ne sont pas cubiques. Doit être coché pour les images de microscopie, les résolutions x/y et z étant différentes. Si la case est décochée, du fait de l'anisotropie de dimensions, des lignes noires apparaîtront sur les vues de profil. L'interpolation permet d'approximer les informations manquantes sur les vues de côté.

5. Cliquer sur Ok pour générer la série de vues.

6. La pile d'images résultat peut être sauvée soit au format tiff multipage (File/Save As/- Tiff), soit sous la forme d'un film avi ou quicktime (voir les menus File/Save As/AVI et File/Save As/Quicktime Movie), soit d'un fichier gif animé (voir le menu File/Save As/Animated Gif).

### **C- Fonctions avancées de visualisation 3D : le greffon ImageJ 3D Viewer**

Bien que n'étant pas directement prises en charge par ImageJ, d'autres représentations 3D sont réalisable au moyen de greffons. On citera par exemple les représentations en isosurface. Le plugin [ImageJ 3D Viewer](#), en plus d'ajouter de nouvelles représentations 3D à ImageJ, il permet une manipulation directe du volume 3D \_à la souris, facilitant l'examen de la reconstruction. La page de téléchargement comporte un tutoriel vidéo, aidant avec les premiers pas avec ce greffon.

### **D- Quantification en 3D**

ImageJ analyse la pile d'images comme étant des images 2D indépendantes les unes des autres. Pour pouvoir étudier un Zstack, il faut télécharger le plugin 3D objet counter.

#### **1. Plugin/ 3D Object Counter/ Set Measurements:**

- Parameters to calculate: permet de déterminer les informations que vous allez obtenir.

Il est conseillé de cocher "Close original images while processing" afin que l'analyse se fasse plus vite et qu'elle ne soit pas arrêtée à cause d'un manque de mémoire.

- Map's parameters: Dots size: pour déterminer la taille en pixel des points représentant le centre des objets
  - Font size: pour déterminer la taille de la police
  - Show numbers: pour afficher le numéro des objets sur l'image des résultats
  - White numbers: pour que l'affichage se fasse en blanc.
- Results Table Parameters: les résultats sont affichés dans une feuille nommée Results à moins que "Store results within a table named after the image" soit coché. La feuille de résultat sera alors nommée "statistic for"+le titre de l'image étudiée.
- Redirect to: fait la segmentation sur l'image active et les intensités sont calculées sur l'image choisie dans Redirect to.

#### **2. Plugin/ 3D Object Counter/ 3D object counter:**

Une fenêtre s'ouvre:

- Threshold : choisissez la valeur pour laquelle les pixels en dessous seront définis comme du fond et au dessus feront partie des objets. Cette valeur

est la même pour toutes les slices. (le slider Slice permet de se déplacer en z)

- Size filter: permet de déterminer les tailles (en voxels) minimale et maximale de objets à étudier
- Exclude objects on edge: à choisir si on ne veut pas compter les objets à cheval sur les côtés (Attention: un stack à 6 côtés!)
- Maps to show: permet de choisir les images de sortie qui vont être affichées. Sur ces images, les intensités de tous les pixels d'un objet ont la même intensité: celle de son étiquette.
- Results to show: Statistics: affiche toutes les informations pour chaque objet trouvé. Summary: affiche un résumé des informations dans une fenêtre Log.

## Chapitre IX: Montage de figures avec FigureJ


Il existe un nouveau Plugin d'ImageJ, facile d'utilisation, dédié à la préparation des figures pour les articles scientifiques : FigureJ (J. Mutterer et E. Zinck). Le temps passé à la création d'une figure est considérablement réduit.

FigureJ intègre la plupart des formats d'images que l'on peut ouvrir dans ImageJ. Il permet de préparer une figure à la résolution requise par l'éditeur (300 dpi par exemple) sans se soucier de la définition de l'image source.

### 1/ Démarrer FigureJ: Plugins/ FigureJ/ FigureJ

Trois nouveaux boutons apparaissent dans la barre ImageJ

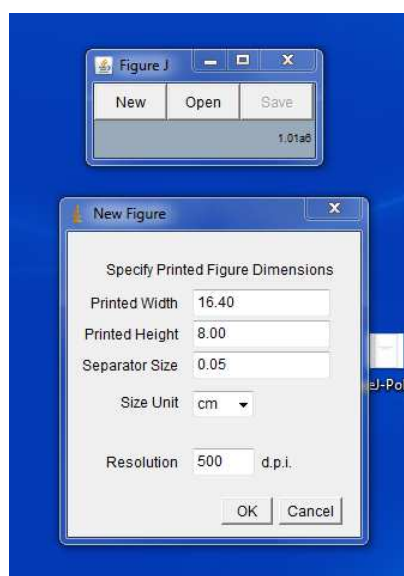


Le bouton  doit toujours être sélectionné pour utiliser les fonctionnalités de FigureJ.

2/ Une nouvelle fenêtre apparaît dans laquelle on peut créer une nouvelle figure, la sauvegarder ou charger une déjà existante.



3/ Après avoir cliqué sur New, définir la dimensions de l'image telle qu'elle est demandée dans les instructions aux auteurs.



Choisissez la taille des séparateurs et la résolution requise en dpi.

#### 4/ Une nouvelle fenêtre apparaît.



Dans cette fenêtre se trouvent les fonctions pour créer la figure.

La partie Layout permet de créer la trame de la figure en divisant ou supprimant des panneaux existants. À partir d'un panneau-père, on peut choisir combien de panneaux fils seront créés.

Le bouton more... donne accès aux fonctions avancées de FigureJ.

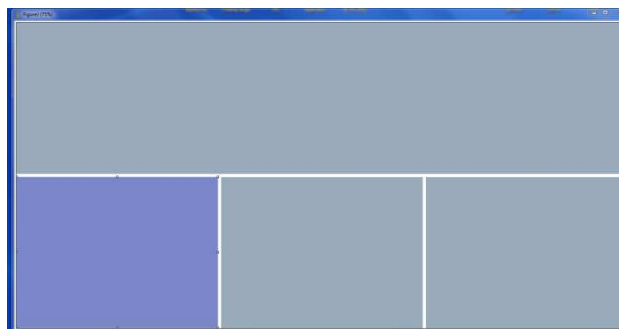
La partie Image permet de choisir les fichiers contenant l'image à afficher dans la figure grâce au bouton Open Image.

Les propriétés d'un panneau peuvent être transmises à un autre panneau grâce aux boutons Copy et Paste.

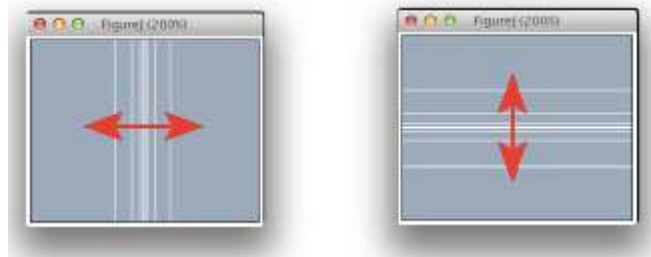
La partie External Tools permet d'accéder aux fonctions spéciales d'un autre logiciel.

#### 5/ Création de la trame de la figure:

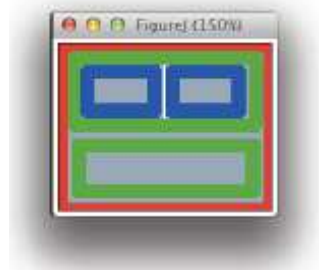
L'espace de la figure peut être séparé horizontalement ou verticalement pour former des panels d'image grâce aux boutons Split.



Les séparateurs verticaux peuvent être déplacés horizontalement et les séparateurs horizontaux verticalement.

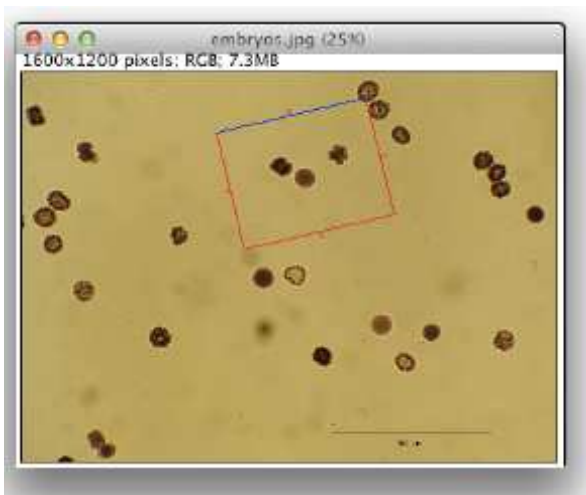


Supprimer un panneau: Si vous supprimez un panneau, il sera fusionné avec le panneau fils généré en même temps que lui. Sur l'exemple suivant, supprimer le panneau vert inférieur aura aussi une incidence sur les deux panneaux bleus. Le nouveau panneau fera la taille de la figure complète.



6/ Charger une image: Cliquez sur le bouton open Image. Sélectionnez le fichier et cliquez sur Open.

L'image s'ouvre et une sélection s'affiche sur l'image. Utilisez cet outil pour sélectionner la région de l'image à insérer dans la figure.



Cette sélection a le même ratio hauteur/largeur que le panneau dans lequel l'image va être insérée.

Pour valider l'image sélectionnée et la transférer dans la figure, cliquez sur le bouton OK.

Si vous souhaitez sélectionner une autre image, cliquez sur le bouton Cancel.

Répétez ces étapes pour chaque panneau de la figure.

7/ Pour ouvrir la fenêtre des options, cliquez sur le bouton more...

Annotations: Des annotations différentes peuvent être appliquées sur chaque panneau. Ces options sont dans la partie Panel Labels.

Pour cela, sélectionnez le panneau et cliquez sur le bouton Draw.

L'index est automatiquement incrémenté.. Pour re-initialiser les indexs, cliquez sur alt et sur le bouton draw.



Pour ajouter une barre d'échelle sur des images calibrées, sélectionner le panneau voulu et ajuster dans Panel ScaleBars la taille de votre barre d'échelle. Les barres d'échelles sont toujours ajoutées en bas à droite du panneau.

Pour ajouter des éléments à la figure, utilisez la section Overlay Items. Utilisez le bouton Text pour ajouter un nouveau texte sur la figure. Ecrivez ensuite votre texte et cliquez sur le bouton add pour ajouter cet élément à la figure.

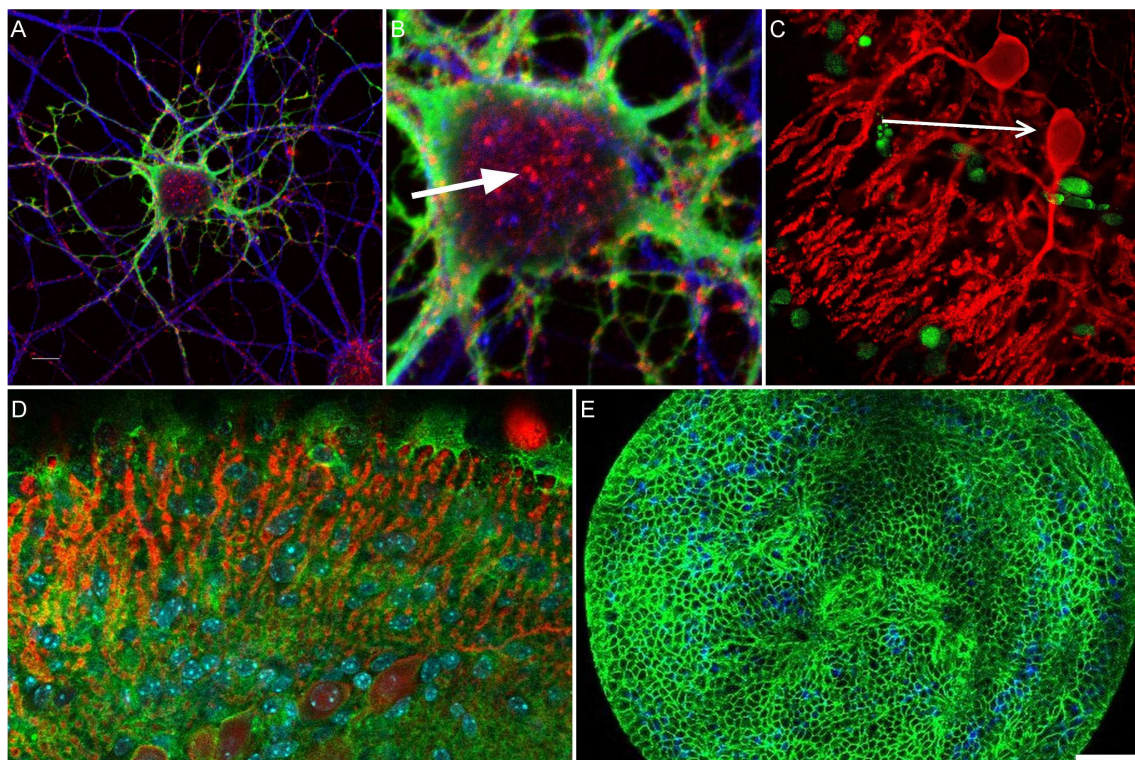
Pour ajouter une ROI à la figure, cliquez sur Add.

Utilisez le bouton Duplicate pour dupliquer la ROI active.

Les boutons hide et show permettent d'afficher ou non les objets ajoutés.

8/ Pour sauvegarder votre figure, cliquez sur le bouton Save.

Les figures sont sauveées dans un format non définitif permettant de les retoucher ultérieurement, ou bien dans un format standard d'image.





Le lien complet de FigureJ est :

<http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:utilities:figurej:start>

# Chapitre X: Raccourcis claviers

<b><u>Commande</u></b>	<b><u>Raccourci</u></b>	<b><u>Description</u></b>
New>Image	n	Crée une nouvelle image ou stack
Open	o	Ouvre TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, etc.
Open Next	shift+o	Ouvre l'image suivante du dossier
Close	w	Ferme la fenêtre active
Save	s	Sauve la fenêtre active en format Tiff
Revert	r	Revient à la version sauvegardée de l'image
Print	p	Imprime l'image active
<hr/>		
Undo	z	Annule la dernière opération
Cut	x	Coupe la sélection
Copy	c	Copie la sélection
Paste	v	Colle la sélection
Clear	backspace	Efface la sélection
Fill	f	Rempli la sélection avec la couleur sélectionnée
Draw	d	Dessine la sélection
Invert	shift+i	Inverse l'intensité des pixels de l'image ou de la sélection
Selection>Select All	a	Sélectionne l'image entière
Selection>Select None	shift+a	Efface la sélection
Selection>Restore	shift+e	Restaure la sélection précédente
Selection>Add to Manager	t	Ajoute la sélection au ROI Manager
<hr/>		
Adjust>Contrast	shift+c	Affiche la fenêtre de Brillance/Contraste
Adjust>Threshold	shift+t	Affiche la fenêtre de seuil
Show Info	i	Affiche les informations de l'image
Properties	shift+p	Affiche les propriétés de l'images
Color>Color Picker	shift+k	Ouvre le "Color Picker"
Stacks>Next Slice	> or →	Affiche le slice suivant du stack
Stacks>Previous Slice	< or ←	Affiche le slice précédent du stack
Stacks>Animation	\	Démarre/ Arrête l'animation du stack
Hyperstacks>Channels	shift+z	Ouvre l'outil "Channels"
Hyperstacks	> or →	Affiche le canal suivant de l'hyperstack

Hyperstacks	< or ←	Affiche le canal précédent de l'hyperstack
Hyperstacks	ctrl+>	Affiche le slice suivant de l'hyperstack
Hyperstacks	ctrl+<	Affiche le slice précédent de l'hyperstack
Hyperstacks	alt+>	Affiche le temps suivant de l'hyperstack
Hyperstacks	alt+<	Affiche le temps précédent de l'hyperstack
Crop	shift+x	Croppe l'image active ou la sélection
Duplicate	shift+d	Duplique l'image active ou la sélection
Scale	e	Redimensionne l'image ou la sélection
Zoom>In	+ ou ↑	Zoome
Zoom>Out	- ou ↓	Dézoome
Zoom>Original Scale	4	Revient au zoom original
Zoom>View 100%	5	Zoom 1:1
<hr/>		
Smooth	shift+s	Applique un smooth 3*3
Repeat Command	shift+r	Répète la commande précédemment faite
<hr/>		
Measure	m	Affiche les statistiques de l'image active ou de la sélection
Histogram	h	Affiche l'histogramme de l'image active ou de la sélection
Plot Profile	k	Affiche le profile de la sélection
Utilities>Capture Screen	shift+g	Réalise une capture d'écran
<hr/>		
Show All	shift+f	Affiche toutes les images
Put Behind	tab	Passe à l'image suivante
ImageJ	enter	Passe la barre IJ en premier