

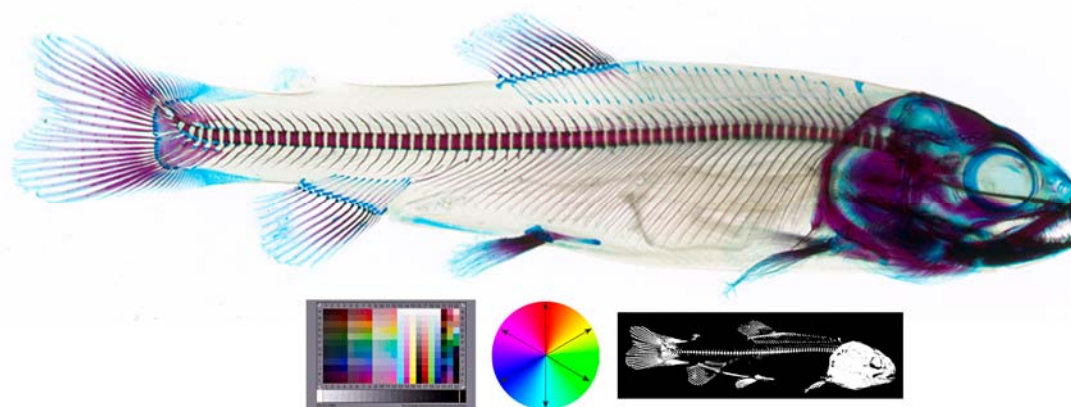
Mesure de l'ossification de poissons à de jeunes stades

Didier Bazin¹

Résumé : *Pour la quantification de structures squelettiques de jeunes poissons, colorées soit en bleu (zones cartilagineuses) soit en rouge (zones ossifiées) nous avons besoin que les couleurs soient fidèles. Pour cela, nous avons utilisé une chaîne graphique calibrée et nous avons appliqué les règles de gestion de la couleur. Nous avons choisi Adobe RGB (1998) comme espace couleur de destination. Les structures squelettiques ont été différenciées en ne considérant que la teinte dans le mode « Teinte Saturation Intensité » (utilisation de la roue chromatique). La quantification des couleurs a été automatisée avec un logiciel d'analyse d'images et les données automatiquement présentées dans des tableaux.*

La gestion de la couleur enlève une importante source de variabilité des mesures. Cependant, la qualité optique des scanners est une autre source de variations et il est préférable de toujours utiliser le même matériel.

Mots clés : poisson, squelette, ossification, calibrage, scanner, espace colorimétrique, profil ICC, roue chromatique



Poisson coloré (grossissement 2,5). En vignettes : charte IT8, roue chromatique et masque

Introduction

Une alimentation inadaptée ou de mauvaise qualité pendant les phases larvaires peut entraîner des malformations chez les poissons. C'est pourquoi, dans un projet européen, notre unité travaille sur l'étude de l'influence de l'alimentation précoce sur la morphogenèse de la truite arc-en-ciel et du bar européen.

L'un des outils mis en oeuvre est une technique de coloration du squelette. Cette technique permet de différencier les parties cartilagineuses (colorées avec du bleu alcian) des parties ossifiées (colorées avec du rouge d'alizarine) du squelette de jeunes truites (tailles comprises entre 20 mm et 45 mm). Ces poissons sont ensuite transparisés et un simple examen visuel

¹ UMR Inra-Ifremer-Université Bordeaux1 - NUAGE (Nutrition, aquaculture et génomique) – Inra Quartier Ibarron 64310 Saint Pée sur Nivelle ☎ 05 59 51 59 74 ✉ Didier.Bazin@St-pee.inra.fr

permet d'observer des différences de coloration. Suivant le stade de développement et l'alimentation, le degré d'ossification peut varier.

Le problème posé, est de pouvoir quantifier et comparer les éléments squelettiques (cartilage et os) et d'automatiser les mesures. La difficulté est que chaque périphérique informatique a son propre espace colorimétrique. Une même couleur est alors décrite par des valeurs RVB (*Rouge Vert Bleu*) différentes, dépendantes de l'espace colorimétrique. Inversement, de mêmes valeurs RVB peuvent décrire des couleurs différentes.

La méthode proposée offre un cadre de travail standardisé afin que les couleurs soient indépendantes de la configuration informatique utilisée.

Matériels et Méthodes

1. Calibrage et caractérisation des périphériques

Pour effectuer nos mesures nous devons avoir soit calibré, soit caractérisé les différents périphériques, écran, scanner.

- Calibrer, c'est agir physiquement sur le matériel pour que les couleurs soient justes.
- Caractériser, c'est analyser les défauts du périphérique afin d'établir une table de conversion des couleurs appelée profil ICC (*international color consortium*).

Autrefois réservé à des spécialistes, le matériel de calibrage est devenu accessible à tous, tant en terme de prix que de simplicité d'utilisation. Les performances sont tout à fait acceptables et suffisantes pour ce type de projet. Le calibrage est à refaire régulièrement car les composants électroniques dérivent au cours du temps.

Nous utilisons le pack logiciel *MonacoEZcolor* avec la sonde *MonacoOptix* de la Société *X-Rite* et deux chartes IT8 (**image 1**) avec leur fichier de référence. L'une des chartes est opaque (format 5"x7") et l'autre transparente (diapos 35mm).

Les profils ICC générés sont automatiquement insérés dans le système d'exploitation (MacOS X ou Windows XP) et pris en compte par celui-ci.



Image 1 : Exemple de charte IT8

1.2 Caractérisation de l'écran

Même si l'affichage à l'écran n'a pas d'influence directe sur nos mesures, il est préférable de caractériser l'écran pour que les couleurs affichées correspondent à la réalité. La caractérisation de l'écran est indispensable si on doit faire du traitement d'images (avec Adobe Photoshop, par exemple). L'écran doit toujours être caractérisé en premier. A noter que la température de couleur préconisée est de 5000 K pour les arts graphiques et de 6500 K pour les travaux classiques. Nous avons opté pour une valeur intermédiaire : 5500 K. D'autre part, bien que le "Gamma" soit traditionnellement différent sur PC (2,2) et sur Mac (1,8), il est préférable de régler tous les écrans sur 2,2 quelle que soit la plateforme.

1.3 Caractérisation du scanner

Pour la capture des images, nous utilisons un scanner A4 (*Epson Perfection 3200* ou *Epson Perfection 4990*) en mode transparent. Les scanners doivent impérativement être caractérisés. Les prises de vues des poissons devront, alors, toujours être faites dans les mêmes conditions

que la caractérisation. Pour cela, nous avons choisi l'option de désactiver tous les automatismes des scanners. Ce n'est pas la solution la plus qualitative mais c'est celle qui présente le moins de risques.

1.4 Validation

Après chaque calibrage nous effectuons une validation. Pour cela, il suffit de scanner une charte graphique, de lui appliquer la gestion des couleurs (cf. paragraphe 3) et de comparer les valeurs colorimétriques de l'image obtenue, avec celles du fichier de référence de la charte. Les valeurs doivent être égales ou très proches.

Pour cette opération, nous utilisons *Adobe Photoshop* et contrôlons les valeurs "Lab" de chacune des cases de couleur. L'*espace Lab* est un espace de référence, indépendant des périphériques (correspond à la vision humaine).

2. Captures des images

Nous utilisons *Adobe Photoshop (CS et CS3)* à la fois pour effectuer la capture des images et pour appliquer la gestion des couleurs (cf. paragraphe 3). C'est également avec ce logiciel que nous faisons la validation du calibrage (contrôle des valeurs de chacune des cases de couleur).

2.1 Positionnement des poissons

Les poissons, avec le glycérol, sont placés dans des fonds de boîtes transparentes (boîtes de culture), dépourvues de rayures. Nous travaillons par lots de poissons (le nombre peut être quelconque) en veillant qu'il n'y ait pas de chevauchement. Les poissons doivent reposer dans le glycérol, sans flotter (**image 2**).

2.2 Options du scanner

Les options du scanner doivent être les mêmes pour toutes les prises de vue. Considérant la taille de nos poissons et la précision dont nous avons besoin, nous avons choisi les options suivantes (*pilote Epson*) :

- Type de document : *Transparent*
- Type de film : *Film positif couleur*
- Type d'image : *24 bits Couleur*
- Résolution : *600 dpi*
- Ajustements : *tous désactivés*

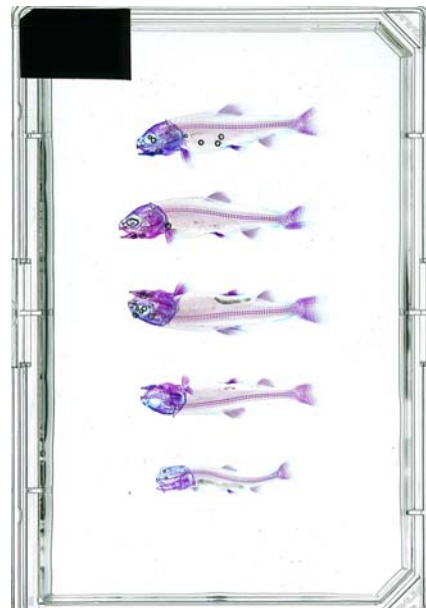


Image 2 : *Positionnement des poissons pour les prises de vue*

Pour ce type de travail, il n'est pas nécessaire de scanner avec une profondeur de couleurs supérieure à 24 bits. Au-delà, les images sont beaucoup plus volumineuses sans apporter de gain qualitatif. La résolution de 600 dpi nous donne suffisamment de détails pour les poissons les plus petits (alevins de truite) tout en évitant d'avoir des images trop volumineuses pour les poissons les plus grands.

Les ajustements peuvent être désactivés (cf. paragraphe 1.3) en cliquant sur le bouton "Configuration" en bas de la fenêtre principale du pilote puis en sélectionnant l'option "Aucune correction de couleur" dans l'onglet "Couleur" de la fenêtre de configuration (**image 3**).

Une autre solution, pour désactiver les automatismes de correction des couleurs, est d'activer l'option "Contrôles de la couleur" avec un Gamma de "2.2" et de décocher "Appliquer automatiquement l'exposition automatique" à partir de l'onglet "Couleur" de la fenêtre de configuration. Valider et, ensuite, dans la fenêtre principale, cliquer sur le bouton "Réinitialiser". Cette procédure donne des résultats plus qualitatifs, mais elle est aussi plus délicate à mettre en œuvre.

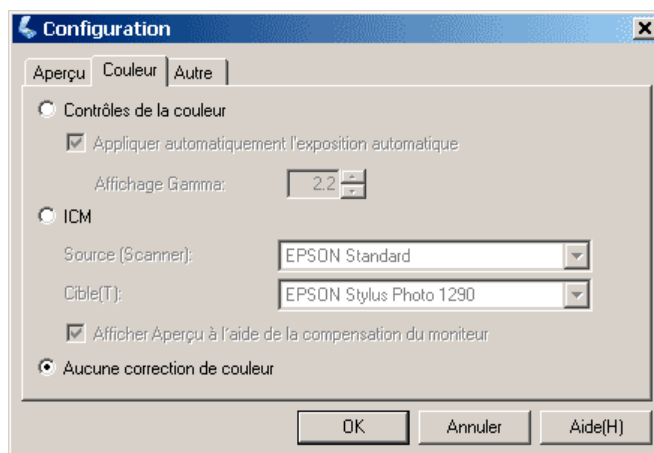


Image 3 : Désactivation de la correction des couleurs

3. Gestion des couleurs

La gestion des couleurs consiste à appliquer la table de conversion des couleurs (profil ICC), obtenue lors de la caractérisation des périphériques (cf. paragraphe 1) et à choisir un espace couleur de destination. Cette opération peut se faire directement au moment du scan, ce qui est possible avec certains pilotes de scanner, ou après l'acquisition de l'image, avec des logiciels comme *Adobe Photoshop*.

Nous avons choisi *Photoshop* pour ses options de conversions très complètes et parce que les scripts permettent d'automatiser le processus. Il est très important de bien respecter l'ordre dans lequel les fonctions sont mises en œuvre : il faut d'abord appliquer "Attribuer un profil" et, ensuite, utiliser "Convertir en profil". Les **images 4 et 5** montre l'effet de l'application de la gestion des couleurs sur l'image d'une charte graphique.

- Attribuer un profil

Avec la commande "Attribuer un profil"² on applique le profil ICC du scanner. Attention, à ce stade, on ne modifie que l'affichage à l'écran (normalement l'image a changé d'aspect) : on ne touche pas les valeurs RVB du fichier image.

- Convertir en profil

Avec la commande "Convertir en profil"³ on détermine l'espace de destination. Cette fois-ci, l'aspect à l'écran devrait rester inchangé mais les valeurs RVB du fichier seront modifiées. Nous avons opté pour l'espace colorimétrique *Adobe RGB 1998* car, d'une part, il est suffisamment grand pour contenir les espaces (*Gamut*) de presque tous les périphériques informatiques et, d'autre part, il n'est pas trop grand et ne nécessite pas de travailler avec des images 12 bits ou 16 bits. C'est l'espace de travail utilisé pour les arts graphiques.

² la position de cette commande dans les menus varie légèrement en fonction des versions du logiciel

³ cette commande se trouve toujours associée à la précédente

Les options de conversion (surtout le 'Mode') ont une grande influence sur la conversion. Il ne faut jamais en changer. Voici les options que nous avons choisies :

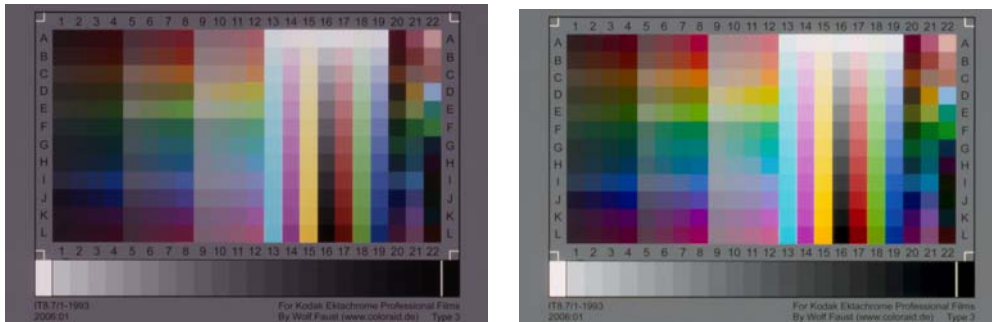
Moteur : *Adobe (ACE)*

Mode : *Colorimétrie Relative*

Compensation du Point Noir : *Oui*

Simulation : *Oui*

Le choix du Mode est très important et très délicat. *A priori*, le Mode *Colorimétrie Perceptive* semblait être le meilleur candidat mais, avec nos images, il s'est avéré être moins bon (perte dans les zones claires) que le Mode *Colorimétrie Relative*.



Images 4 et 5 : Aspect d'une charte graphique avant (gauche) et après (droite) la gestion des couleurs.

4. Traitement des images

A ce stade, il est possible de traiter l'image afin d'en améliorer la qualité. Ainsi, on peut tenir compte de la densité optique de la boîte contenant les poissons et augmenter le contraste des structures squelettiques, à condition de ne toucher qu'à la luminosité (le mode d'extraction des couleurs sera insensible à la luminosité) et de n'agir que globalement.

Remarque : beaucoup de fonctions de Photoshop modifient insidieusement les couleurs, c'est notamment le cas des filtres de netteté.

Pour ce projet, nous avons scanné une boîte ne contenant que du glycérol et, ainsi, nous avons évalué la perte de luminosité et ajusté les corrections de l'histogramme.

Maintenant que nous avons traduit les valeurs RVB dans l'espace de destination (**cf. paragraphe 3**), et que nous avons apporté des corrections à l'image, celle-ci peut être sauvegardée, sans profil, dans le format qui conviendra au logiciel d'analyse d'image sachant que le format TIFF, parce qu'il ne modifie pas les pixels, est préférable au format JPEG.

5. Analyse des couleurs

Le mode RVB n'est pas bien adapté pour l'extraction de couleurs nous avons opté pour le mode de représentation TSI (*Teinte Saturation Intensité*). Nous ne considérons que la teinte selon les valeurs de la roue chromatique (**image 6**).

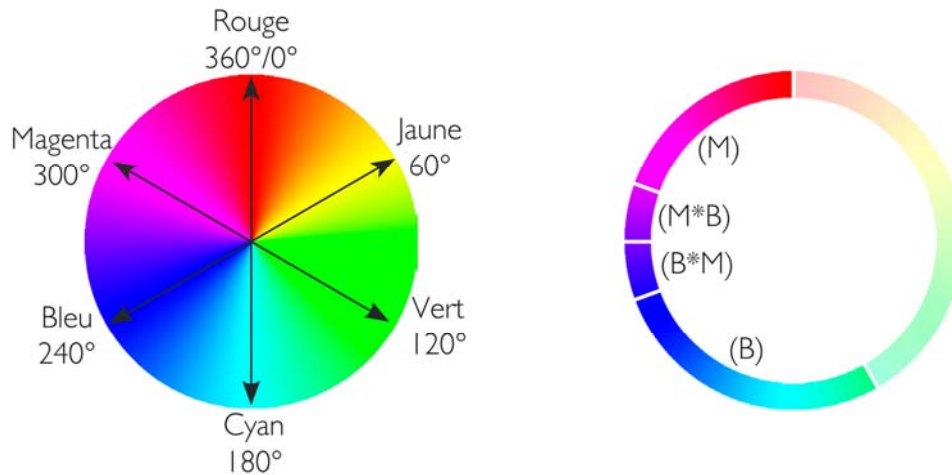


Image 6 : Roue chromatique

Des poissons, colorés uniquement avec du bleu ou du rouge, nous ont permis de déterminer les plages de teintes "pures" :

- structures cartilagineuses (B) : entre 150° et 224° ;
- structures ossifiées (M) : entre 291° et 360°.

On peut voir que ces deux zones sont disjointes, il n'y a donc pas de risque de confusion.



Image 7 : Alevin de truite dont le squelette a été coloré

Les poissons colorés simultanément avec du bleu alcyan et du rouge d'alizarine ajoutent de la complexité (**image 7**) : d'autres teintes apparaissent soit parce que des structures sont superposées (au niveau de la tête) soit parce que la calcification a commencé mais n'est pas complète. Ces nouvelles teintes viennent s'intercaler entre les deux zones précédentes et peuvent prendre toutes les valeurs entre 225° et 290°. Nous avons subdivisé ces nouvelles teintes en deux zones :

- bleu majoritaire (B*M) : entre 225° et 270° ;
- magenta majoritaire (M*B) : entre 271° et 290°

Les teintes situées entre 0° et 149° sont exclues.

On peut être amené à effacer de l'image les autres tissus, comme les intestins, sources potentielles d'erreurs.

Les composants électroniques (dont les capteurs des scanners) ont beaucoup de difficultés à reconnaître les couleurs dans les zones de luminosité extrême (très claire ou très sombre) ou en cas de faible saturation. Les teintes deviennent aléatoires. Après observations détaillées des

teintes sur un groupe de poissons, nous avons choisi d'éliminer les éléments dont la luminosité est inférieure à 1,5% ou supérieure à 98% ainsi que ceux dont la saturation est inférieure à 2,7%. Les éléments très petits, moins de 3 pixels, sont également éliminés car ils sont souvent dus au bruit électronique.

Le programme d'analyse commence par isoler l'ensemble du squelette par extraction de toutes les teintes informatives (de 150° à 360°), en appliquant les seuils décrits ci-dessus. Les mesures sont faites sur l'image résultante, après segmentation des quatre groupes de teintes, sans appliquer les seuils.

Nous effectuons deux types de mesures sur les structures colorées (zone par zone) :

- la surface,
- la densité optique intégrée.

Nous utilisons le logiciel d'analyse d'images *ImagePro Plus* pour extraire les teintes et son langage *IPBasic* pour automatiser le travail. L'opérateur sélectionne les poissons manuellement et le programme les traite par lots. Les données sont envoyées directement dans des tableaux *Microsoft Excel*.

6. Exemple de mesures

Pour la démonstration, nous avons utilisé trois poissons de taille équivalente, mais à des stades d'ossification différents (**image 8**). La gestion des couleurs a déjà été effectuée, l'image est alors prise en charge dans le logiciel d'analyse d'images.

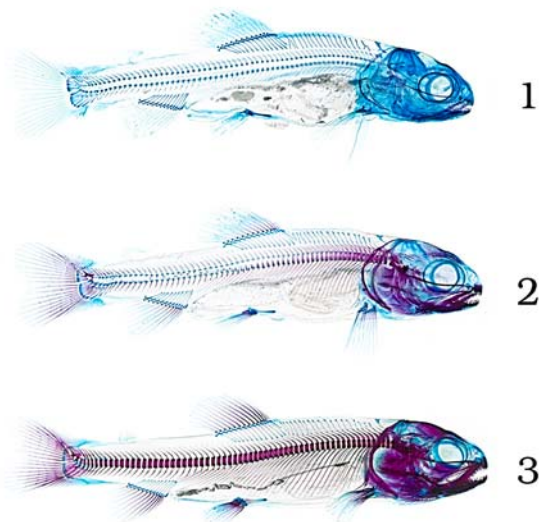


Image 8 : *Trois alevins de truite à des stades d'ossification différents suivant leur alimentation*

Nous enregistrons les données dans des tableaux Excel (le **tableau 1** a été présenté en deux pour les besoins de cet article, les deux parties sont normalement alignées). Le tableau du haut reçoit les données tandis que celui du bas contient des formules qui calculent les pourcentages de chaque groupe de couleur par rapport au total.

	Lg (mm)	Area				IOD			
		Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta	Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta
1	30,4	45086	405	3	2	12418	304	0	1
2	30,5	24178	10699	4856	1541	3978	3587	2331	940
3	31,6	14754	7924	6070	11564	3101	3159	3037	8418
Moy	30,83	28006	6343	3643	4369	6499	2350	1789	3120

Area (Teinte / Totalité) * 100				Mag-Bleu + Magenta	IOD (Teinte / Totalité) * 100			
Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta		Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta
99,10	0,89	0,01	0,00	0,01	97,60	2,39	0,00	0,01
58,58	25,92	11,77	3,73	15,50	36,71	33,10	21,51	8,67
36,60	19,66	15,06	28,69	43,75	17,50	17,83	17,14	47,52
64,76	15,49	8,95	10,81	19,75	50,60	17,77	12,88	18,73

Tableau 1 : Tableau de valeurs créé par le logiciel d'analyse d'images

Les Surfaces (*Area*) sont exprimées en *Pixels*² et les Densités Optiques Intégrées (*IOD*) sont calculées après calibrage des luminosités selon la courbe de Densité Optique Standard. Les longueurs (*Lg*) sont obtenues à partir du squelette complet par le calcul du *Diamètre de Féret* le long du plus grand axe. Cette mesure (*Lg*) est équivalente à la longueur totale. Les valeurs moyennes s'affichent en bas du tableau.

Un clic sur un bouton lance une macro qui crée des graphiques à partir de tous les échantillons contenus dans la feuille Excel ; nous obtenons un graphique pour chaque couleur de chacun des deux types de mesures. Les séries sont formées par les groupes d'échantillons.

7. Discussion

7.1 Coloration des poissons

L'utilisation d'eau oxygénée au cours de la préparation des poissons peut être la source d'apparition de bulles dans le corps de ceux-ci. Les bulles peuvent masquer des structures colorées ou, au contraire, prendre des reflets qui seront comptabilisés.

La chair des poissons, lorsqu'elle est insuffisamment transparisée lors de la digestion enzymatique (trypsine), peut fixer les colorants (surtout le *Bleu Alcian*) et être prise en compte lors des mesures. Il en est de même pour les contenus digestifs.

Il peut être nécessaire de les masquer avant de lancer les mesures.

Tout cela est source d'erreurs qu'il faut chercher à minimiser lors de la préparation des poissons.

7.2 Mise en place des poissons pour les prises de vue

Les poissons ne doivent pas flotter dans le glycérol car, dans ce cas, ils peuvent se courber ou s'orienter de biais et fausser les mesures. D'autre part, s'ils flottent, cela les éloigne du point de focalisation du scanner et les images sont moins nettes (problème de profondeur de champ).

Les récipients doivent être propres et sans rayures.

7.3 Capture des images

Les scanners n'ont pas tous la même qualité optique et cela a un impact important sur les mesures. Si les mesures sont parfaitement répétables avec un même scanner, il peut y avoir des divergences entre des scanners différents. Nous avons testé deux scanners *Epson Perfection* ; l'un et l'autre ont des avantages et des inconvénients.

- Le scanner *Epson Perfection 3200* a l'avantage d'avoir une bonne profondeur de champ. Les structures squelettiques sont nettes sur toute l'épaisseur des poissons. Par contre, ce scanner a du mal à distinguer les éléments presque transparents sur fond clair. Il s'agit, le plus souvent, de structures cartilagineuses (colorées en bleu) comme les rayons de nageoires. Le cartilage des nageoires a tendance à être sous-estimé. Les poissons les plus grands sont moins sensibles à ce problème (**tableau 2**).

- Le scanner *Epson Perfection 4990* a l'avantage de mieux différencier les structures presque transparentes sur fond clair. Par contre, il dispose d'une faible profondeur de champ. Les structures, qui ne sont pas dans le plan focal, sont floues. Ce flou entraîne une surestimation de la surface. Par exemple, des vertèbres peuvent paraître soudées et l'espace intervertébral est alors comptabilisé ou, encore, des arêtes sont un peu empâtées et leur surface est augmentée. Le flou peut également provoquer le mélange des teintes et, ainsi, provoquer un décalage de teintes pures (*Bleu Alcian* et *Rouge d'Alizarine*) vers des teintes intermédiaires. Les poissons les plus grands sont les plus sensibles à ce phénomène (**tableau 3**).

Pour limiter les anomalies de mesures, il faut faire en sorte :

- que la coloration des poissons soit la plus intense possible, jusque dans les rayons des nageoires ;
- que les poissons soient positionnés bien à plat, le plus près possible de la vitre du scanner.

A noter que certains scanners permettent de décaler le point de focalisation. Cela apporte une plus grande précision des images.

Les **tableaux 2 et 3** ci-dessous, présentent les résultats obtenus avec ces deux scanners à partir d'un même lot de poissons.

	Lg (mm)	Area				IOD			
		Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta	Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta
1	21,6	11206	4940	1553	669	3552	2188	865	619
2	33,5	16992	14984	9164	12155	5588	8239	5593	8041
3	26,7	16543	8616	5278	3363	4997	3325	2692	2700
4	34,2	12100	13000	10184	16538	3989	5507	5319	11008
5	33,4	11301	10141	11225	19038	3110	3534	5526	13962
Moy	29,88	13628	10336	7481	10353	4247	4559	3999	7266

Area (Teinte / Totalité) * 100				IOD (Teinte / Totalité) * 100			
Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta	Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta
61,01	26,89	8,45	3,64	49,17	30,29	11,97	8,57
31,88	28,12	17,19	22,81	20,35	30,00	20,37	29,28
48,94	25,49	15,62	9,95	36,44	24,25	19,63	19,69
23,35	25,09	19,65	31,91	15,45	21,33	20,60	42,63
21,86	19,61	21,71	36,82	11,90	13,52	21,15	53,43
37,41	25,04	16,52	21,03	26,66	23,88	18,74	30,72

Tableau 2 : Mesures obtenues avec le scanner *Epson Perfection 3200*

	Lg (mm)	Area				IOD			
		Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta	Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta
1	21,9	13734	5703	1490	369	3821	2189	881	340
2	33,4	20602	17821	10567	10571	6345	8991	5602	7095
3	26,8	21120	10313	4989	2612	5699	3338	2675	2133
4	33,7	16402	14293	11905	16077	4234	5739	5790	9278
5	33,2	15937	13041	13314	17703	3409	4387	6500	11759
Moy	29,80	17559	12234	8453	9466	4702	4929	4290	6121

Area (Teinte / Totalité) * 100				IOD (Teinte / Totalité) * 100			
Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta	Bleu	Bleu-Mag	Mag-Bleu	Magenta
64,49	26,78	7,00	1,73	52,84	30,27	12,18	4,70
34,59	29,92	17,74	17,75	22,63	32,07	19,98	25,31
54,11	26,42	12,78	6,69	41,16	24,11	19,32	15,41
27,95	24,36	20,29	27,40	16,91	22,92	23,12	37,05
26,56	21,74	22,19	29,51	13,08	16,84	24,95	45,13
41,54	25,84	16,00	16,62	29,32	25,24	19,91	25,52

Tableau 3 : Mesures obtenues avec le scanner Epson Perfection4990

7.4 Gestion des couleurs

Lors de la gestion des couleurs, le passage d'un espace colorimétrique à un autre se fait par approximation des couleurs à partir d'une table de conversion. Il y a donc forcément de petites inexactitudes. Nos contrôles ont montré que, pour un même lot de poissons, les teintes variaient très peu entre deux mesures successives faites avec un même scanner ou avec un scanner différent (sur des structures squelettiques nettes).

7.5 Extraction des teintes

Il existe plusieurs modèles de représentation des couleurs selon la teinte, la saturation et la luminosité (intensité). Il peut donc y avoir des divergences entre deux logiciels d'analyse d'images utilisant des modèles différents.

7.6 Mesure de la longueur totale

La longueur totale (*diamètre de Féret* sur le plus grand axe) est parfois sous-estimée car les structures de l'extrémité de la nageoire caudale ne sont pas toujours correctement prises en compte. Cette mesure est donc une mesure approximative, par défaut.

Conclusion

Cette technique d'analyse colorimétrique du squelette de jeunes poissons utilisée depuis quelques mois donne satisfaction. Le calibrage des périphériques et l'utilisation de profils ICC rendent l'analyse des couleurs indépendante du matériel. Les résultats sont fiables et reproductibles. Cependant, les différences entre les scanners sont à l'origine de petites différences entre les images résultantes. Pour une plus grande précision des mesures, il est préférable de toujours utiliser le même matériel et dans les mêmes conditions d'utilisation.

Bibliographie

- Niemetsky G. (2005) *Calibrage facile pour la photographie* (Ed. Color.Academy) 116p
 Delmas J. (2005) *La gestion des couleurs pour les photographes* (Ed. Eyrolles) 200p
 Willmore B. (2004) *Photoshop CS – Techniques de Studio* (Ed. First) 622p
 Evening M. (2004) *Photoshop CS pour les photographes* (Ed. Eyrolles) 408p