

# Une méthode d'analyse d'image automatique pour quantifier rapidement les nombres d'œufs et les taux de parasitisme chez *Trichogramma* sp.

Guy Perez<sup>1</sup>, Victor Burte<sup>1</sup>, Olga Baron<sup>1</sup>, Vincent Calcagno<sup>1</sup>

**Résumé.** Nous présentons ici une méthode simple et pratique de comptage automatique permettant de dénombrer des œufs et quantifier le taux de parasitisme chez les parasitoïdes oophages, en particulier ceux du genre *Trichogramma*. La méthode repose sur l'analyse d'images en couleurs, combinant analyse discriminante et segmentation, afin d'être adaptable à tout type d'images. Elle prend la forme d'un « plugin » pour le logiciel ImageJ/FIJI, appelé CODICOUNT, facilement utilisable et disponible librement. Nous illustrons pas à pas la mise en œuvre de la méthode et évaluons sa performance. Notre méthode apporte à l'opérateur un gain de rapidité et une plus grande fiabilité des comptages lors des élevages et des expérimentations avec les trichogrammes, permettant ainsi de produire des données plus riches et/ou plus nombreuses. La méthode peut aussi être étendue à d'autres applications, en entomologie et au-delà.

**Mots clés :** analyse d'images, comptage automatique, image J, parasitoïdes, phénotypage

## Contexte et objectifs de la méthode

Les parasitoïdes du genre *Trichogramma* (Pinto et Stouthamer, 1994) sont parmi les principaux auxiliaires de culture utilisés en lutte biologique (Hawlitzky, 1992 ; Consoli et al., 2010). Comme de nombreux autres parasitoïdes oophages, ce sont de minuscules insectes (moins d'un millimètre de long pour les adultes), dont l'élevage impose de les manipuler à grande densité, ce qui rend difficile leur dénombrement. Cependant les œufs hôtes, typiquement de l'espèce *Ephestia kuehniella*, l'hôte de substitution universel utilisé pour la production de trichogrammes (Daumal et al., 1975), une fois parasités, subissent un changement de couleur important : du fait du développement de la puppe de trichogramme en leur sein, ils deviennent beaucoup plus foncés, tendant vers le noir. Les études sur les trichogrammes impliquent de procéder en routine au comptage de grands nombres d'œufs (plusieurs centaines voire milliers) parasités ou non, pour suivre l'effectif des populations dans les élevages, évaluer le succès de parasitisme de différentes souches dans différentes conditions (Bigler, 1994), ou encore estimer des distances de dispersion (Grieshop, 2005 ; Morel-Journel et al., 2015). Ces comptages, effectués à l'œil, représentent une tâche répétitive et fastidieuse, requièrent un temps considérable, et sont de plus soumis à des erreurs non négligeables et fluctuantes entre expérimentateurs. L'objectif de cet article est de présenter une méthode automatique de comptage des œufs d'*Ephestia kuehniella* sains et/ou parasités par des trichogrammes. Cette méthode vise à apporter à l'opérateur un gain de rapidité, une meilleure standardisation et ainsi une plus grande fiabilité des comptages lors des élevages et des expérimentations avec les trichogrammes. Cette méthode est développée sous forme d'un plugin ImageJ (Schneider et al., 2012), appelé CODICOUNT, facilement utilisable et disponible gratuitement. La méthode se prête également à d'autres types d'expérimentations (autres espèces de parasitoïdes, voire organismes entièrement différents).

## Utilisation du plugin ImageJ CODICOUNT

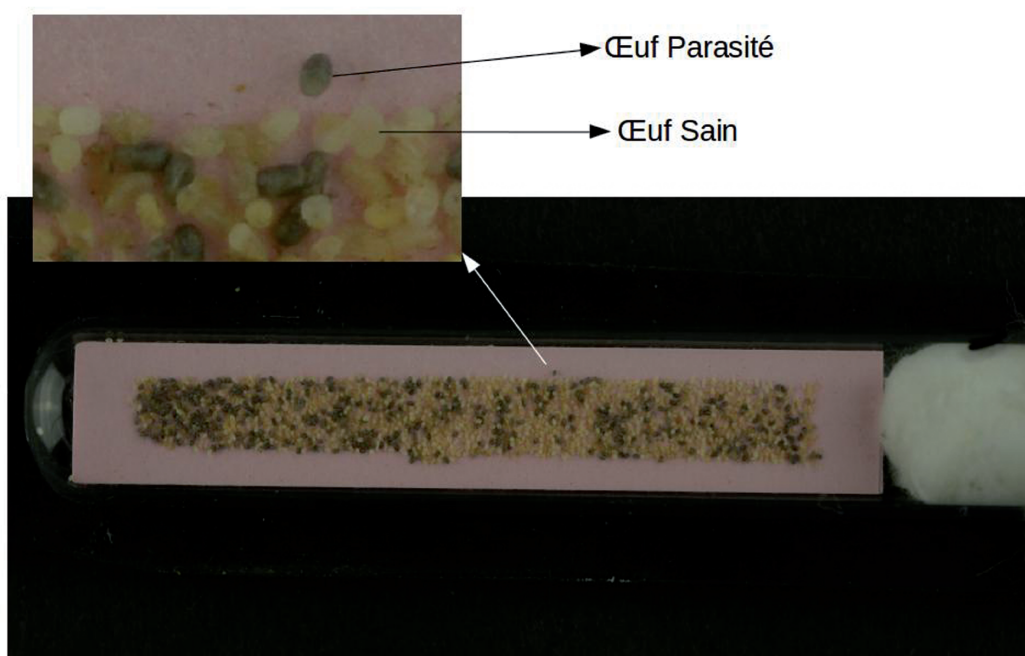
### Principe général

La méthode mise en œuvre consiste à segmenter l'image en trois zones, c'est-à-dire que chaque pixel de l'image va être assigné à l'une des trois catégories que l'on cherche à séparer : à savoir le fond, les œufs sains (non parasités), et les œufs parasités. Là où les méthodes de segmentation classiques utilisent une image en niveaux

<sup>1</sup> Institut Sophia Agrobiotech, INRA-CNRS-UCA, 06900 Sophia Antipolis, France  
guy.perez@inra.fr

de gris, CODICOUNT cherche à utiliser au mieux l'information colorimétrique disponible dans les images RGB. Pour ce faire, le plugin utilise une méthode de classification supervisée : à partir d'échantillons de pixels des trois zones, il calcule la transformation optimale permettant de discriminer les trois zones dans l'espace des couleurs. Ceci est réalisé par deux analyses discriminantes successives (via un dialogue avec le logiciel R) : la première pour discriminer le support sur lequel les œufs sont collés et la seconde pour distinguer les deux catégories d'œufs. En outre, ceci est fait dans deux espaces colorimétriques (RGB et HSB). A chaque étape, le seuil de discrimination optimal est déterminé en minimisant les erreurs de classification sur les échantillons de pixels fournis. De ce fait, CODICOUNT est capable de s'adapter à différents types d'images (couleurs de fond, âge des œufs hôtes, espèces de trichogrammes...) en tirant au mieux parti des différences de couleur existantes entre les zones.

Une fois l'image segmentée, le logiciel compte le nombre de pixels appartenant à chacune des trois zones. Lors des élevages de trichogrammes, les œufs hôtes sont typiquement en grand nombre et en forte densité, c'est à dire qu'ils se touchent, voire s'occultent partiellement comme sur la **Figure 1**. De plus, ils ont une forme ellipsoïde et non sphérique, ce qui fait que la forme qu'ils présentent varie selon l'angle selon lequel ils sont disposés sur le support. Les approches de comptage automatique cherchant à identifier des entités isolées (analyses de particules) ou des formes (par exemple les analyses de blob ou les filtres de Hough) sont donc difficilement applicables (Nixon et Aguado, 2012). CODICOUNT propose une approche plus simple, bien adaptée à ce genre de situation. Par le théorème de la limite centrale (« loi des grands nombres »), le nombre total d'œufs peut être estimé précisément en divisant le nombre de pixels par la taille moyenne (en nombres de pixels) d'un œuf sur les images. L'utilisateur peut fournir lui-même une taille moyenne pour les œufs à compter, mais CODICOUNT propose aussi une façon simple et intuitive de lui apprendre cette taille. Ainsi, outre des nombres de pixels et des fractions de surface, CODICOUNT peut également déterminer des nombres d'œufs (sains et parasités).



*Figure 1. Exemple d'image sur laquelle des œufs d'Ephestia parasités par Trichogramma sont à compter (photos : G.Perez).*

Pour un maximum de flexibilité, CODICOUNT fonctionne en écrivant pour l'utilisateur un code ImageJ (une macro) qui contient tous les réglages qu'il a déterminés lors de la phase d'apprentissage (calibration). Cette macro peut être sauvegardée (ce qui facilite la répétabilité et la traçabilité des expériences), modifiée (ce qui permet à l'utilisateur de personnaliser totalement à la main les réglages s'il le désire), et appliquée en batterie sur des dossiers entiers d'images (ce qui facilite le déploiement et permet un gain de temps significatif).

## Matériel requis, téléchargement et installation

CODICOUNT prend la forme d'un plugin, écrit en JAVA, pour le logiciel de traitement d'images « Image J » (Schneider et al., 2012; lien de téléchargement de Image J : <https://imagej.nih.gov/ij/>). Le plugin fonctionne aussi bien avec ImageJ qu'avec sa distribution la plus récente « FIJI » (Schindelin et al., 2012). Il fait également appel au logiciel R, qui doit donc être installé aussi (R Core Team 2015; lien de téléchargement du logiciel R : <https://www.r-project.org/>). Ces deux logiciels sont libres et multi-plate-formes, et peuvent donc être installés sur tout poste de travail (Windows, MacOS, ou Linux).

L'installation de ces deux logiciels est suffisante sous les plateformes Linux et MacOS. Pour les machines utilisant Windows, il faut de plus indiquer à CODICOUNT où est installé le programme R sur l'ordinateur. Pour ceci, ouvrir le fichier « CODICOUNT.jar » (avec un utilitaire de gestion d'archives comme WinZip), et, à l'intérieur, ouvrir le fichier « CODICOUNT\_config.txt » avec un éditeur de texte. Il suffit alors d'indiquer le chemin qui conduit au dossier où R est installé (très précisément, le dossier dans lequel le programme « Rscript.exe » se trouve, par exemple C:\Program Files\R\R-3.0\bin). Remplacer le chemin indiqué par défaut par celui correspondant à l'installation, et sauvegarder la modification.

Pour procéder à l'installation du plugin CODICOUNT dans ImageJ/FIJI, il y a deux façons de procéder :

- ✓ la première consiste, dans FIJI, à rajouter le site <http://sites.imagej.net/Cvince/>, dans la liste des « Update Sites ». Il faut pour cela lancer l'Updater (« Help > Update... ») puis cliquer sur « Manage Update Sites ». Ainsi CODICOUNT sera directement installé et mis à jour lorsque de nouvelles versions seront disponibles ;
- ✓ la seconde, plus classique pour ImageJ, consiste à télécharger le fichier du plugin « \_CODICOUNT.jar », à l'adresse <http://sites.imagej.net/Cvince/plugins/>. Les différentes versions sont alors disponibles : prendre la plus récente, et télécharger le fichier. Le renommer de sorte à enlever le numéro de version faisant suite à « .jar » dans le nom. Ensuite, dans ImageJ, utiliser la commande « Install » du menu « Plugins » (ou utiliser le raccourci « Ctrl+Maj+M ») et aller chercher le fichier « \_CODICOUNT.jar ». Enfin, cliquer sur « OK » pour lancer l'installation.

Une fois l'installation réalisée, il y a désormais dans le menu « Plugins » un nouvel élément nommé « CODICOUNT », prêt à être utilisé.

Les images à compter doivent être prises en couleur (RGB), comme sait le faire tout appareil photo numérique moderne (reflex, compact ou smartphone). Les œufs doivent être disposés sur un fond (carton, plastique, post-it®...) de couleur contrastée (rose, bleu, vert, etc.), différente de celle des œufs, afin de maximiser la capacité de discrimination. Il est souhaitable d'éviter au maximum les reflets et les ombres portées. Il faut donc jouer sur la hauteur et l'inclinaison de(s) source(s) de lumière par rapport à l'objet photographié. Afin d'obtenir un maximum d'informations, il ne faut pas hésiter à augmenter autant que possible la résolution de l'image. Les images doivent être de préférence au format TIFF non compressé, mais peuvent également être en JPEG, avec un niveau de qualité suffisant (netteté, absence de tâches...). Le plus important est de maintenir constants les paramètres de prise de vue (exposition, mise au point, position de l'appareil, distance au sujet...) entre les différentes photos à compter, afin de ne procéder qu'à une seule étape de calibration et d'obtenir les meilleurs résultats possibles.

## En pratique : guide d'utilisation

Une fois le plugin correctement installé voici une description des étapes à suivre dans ImageJ/FIJI. Le cheminement général est résumé dans un diagramme en **Figure 2**, et le mode opératoire est détaillé dans un tutoriel en ligne à cette adresse : <http://www6.paca.inra.fr/institut-sophia-agrobiotech/CODICOUNT>.



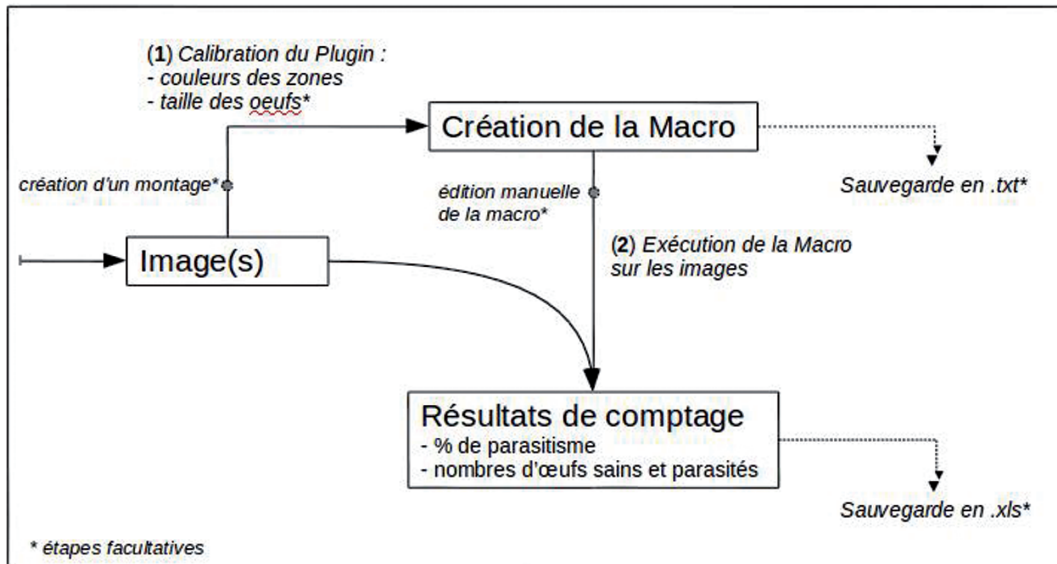


Figure 2. Diagramme résumant l'enchaînement des étapes lors de l'utilisation du plugin CODICOUNT.

Après analyse d'une ou de plusieurs images, le plugin génère un tableau Excel, contenant, pour chaque image, la surface d'œufs sains, la surface d'œufs parasités, le pourcentage de parasitisme et optionnellement, les nombres d'œufs sains et parasités (Figure 3).

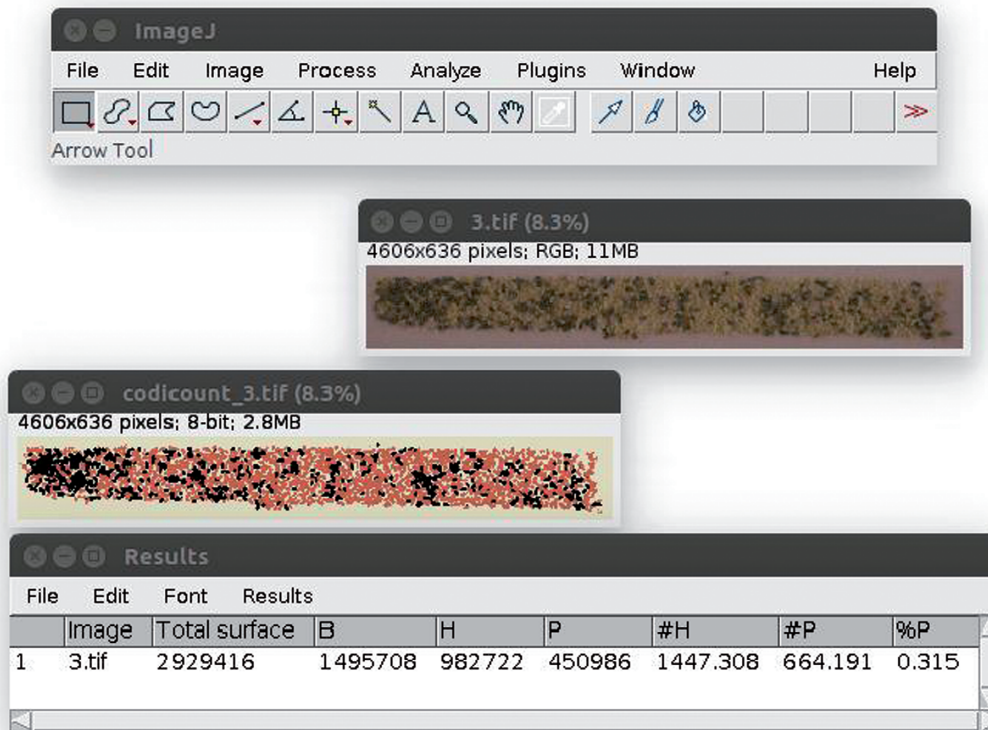


Figure 3. Capture d'écran d'une étape de l'analyse : résultat de l'exécution de la macro et obtention du tableau de résultats (photos : G. Perez).

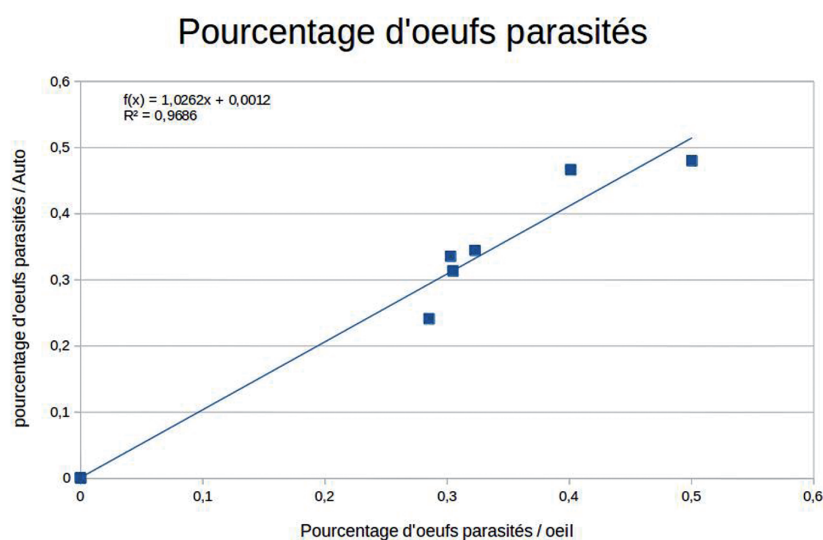
## Exemple de mise en pratique et validation des résultats

Nous avons testé cette méthode sous différentes conditions au laboratoire. Nous présenterons ici un test avec l'espèce *Trichogramma cacaeciae*, élevée sur des œufs de l'espèce hôte *Ephestia kuehniella*, préalablement traités aux UV pour stopper leur développement.

Les œufs sont collés sur des bandelettes de papier Canson® de couleur rose (L = 5 cm, l = 9 mm). Le nombre d'œufs n'est pas précisément contrôlé, mais ne varie pas de façon très importante. Ces bandelettes sont placées dans des tubes à essai standard d'1 cm de diamètre. Des femelles trichogrammes prêtes à pondre sont introduites dans les tubes, puis les tubes sont obstrués par du coton et placés dans des enceintes climatiques : température 25°C, taux d'humidité 80 %, éclairage 12 :12. Huit répétitions (tubes) sont réalisées pour ce test, variant quant au taux de parasitisme attendu (nombres de femelles introduites initialement). Pour deux des tubes, aucune femelle n'a été introduite (tubes témoins).

Après trois jours, les œufs parasités commencent à s'assombrir. Au cinquième jour, chaque tube est pris en photo. Le matériel d'acquisition est un appareil « Nikon® D800 » avec un objectif macro de 60 mm. L'appareil photo est fixé sur un pied. La distance, l'orientation verticale et horizontale de l'objectif sont définies avec précision afin d'avoir les mêmes conditions de prise de vues pour l'ensemble des images. L'appareil photo est relié à un ordinateur pour piloter tous les réglages à distance, déclencher les prises de vue et récupérer les images. Nous avons utilisé les paramètres suivants : ouverture F/8.0, vitesse 1/160s, Iso 400, permettant d'assurer une netteté satisfaisante sur l'ensemble de l'image.

Chaque image est comptée manuellement (nombre d'œufs sains et nombre d'œufs parasités), ainsi qu'en utilisant la méthode automatique, en suivant les étapes décrites dans la section précédente. La calibration de la taille des œufs est faite, afin d'obtenir le nombre d'œufs et non pas uniquement le pourcentage de parasitisme. Les résultats manuels et automatiques sont confrontés, en calculant le coefficient de détermination  $R^2$  entre eux, et en effectuant une régression linéaire du comptage automatique sur le comptage manuel. Les résultats sont présentés dans les **Figures 4 et 5**.



**Figure 4.** Comparaison du pourcentage de parasitisme obtenu par les deux méthodes (automatique et manuelle).  $f(x)$  est la droite de régression linéaire et  $R^2$  est le coefficient de détermination associé.

La **Figure 4** illustre la relation entre les deux méthodes de comptage (manuelle et automatique) pour le pourcentage de parasitisme. Le coefficient de détermination élevé indique que la relation est globalement très bonne entre les deux méthodes. La valeur du  $R^2$  peut fluctuer entre 0,9 et 1 selon l'expérimentateur, mais est toujours très satisfaisante. Il est important de noter que la valeur obtenue par comptage manuel n'est pas exempte d'erreurs : il est en effet assez laborieux de compter les œufs sains, ce qui fait que les nombres obtenus par différents



expérimentateurs (ou par le même expérimentateur entre différents comptages) présentent eux-mêmes une certaine variabilité. Ainsi, même si la méthode de comptage automatique avait un taux d'erreur nul, nous n'obtiendrions pas un  $R^2$  égal à 1, en raison des erreurs dans le comptage manuel. Par ailleurs, l'équation de la droite de régression (ordonnée à l'origine quasi nulle, pente quasiment égale à un) indique une absence de biais. CODICOUNT permet donc de fournir des comptages précis et sans biais, suffisants pour la plupart des applications.

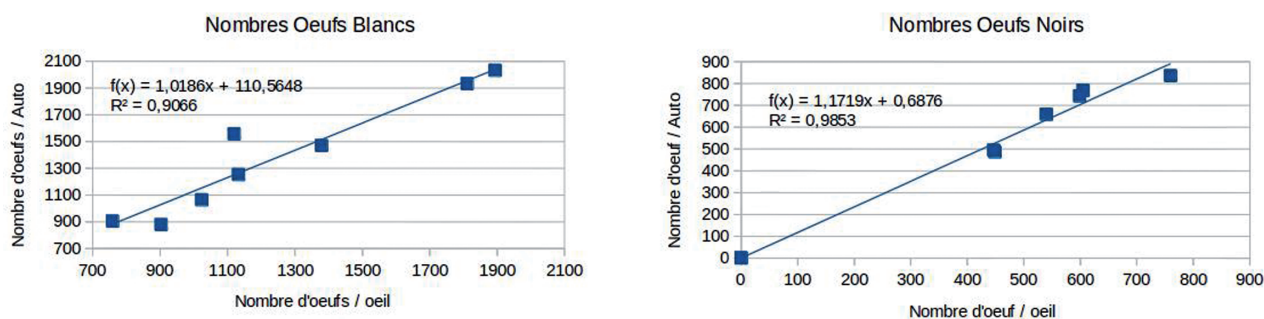


Figure 5. Comparaison du nombre d'œufs sains et parasités comptés par les deux méthodes (automatique et manuelle).  $f(x)$  est la droite de régression linéaire et  $R^2$  est le coefficient de détermination associé.

La Figure 5 présente les résultats quant aux nombres d'œufs parasités, et aux nombres d'œufs sains. Là encore, les  $R^2$  sont satisfaisants. La valeur de  $R^2$  est un peu moins élevée dans le cas des œufs sains, ce qui peut s'expliquer par la plus grande difficulté à compter ces derniers (y compris manuellement) comme indiqué plus haut. Les équations des droites de régression sont également satisfaisantes. La valeur de la pente dépend directement de l'estimation de la taille moyenne d'un œuf faite lors de la calibration du plugin. Il est à noter que s'il s'agit de comparer différentes modalités expérimentales, ou différentes souches entre elles, en termes de taux de parasitisme, alors il n'est pas nécessaire de calibrer la taille des œufs : les nombres de pixels peuvent directement être utilisés pour les comparaisons. Ils sont en effet égaux aux nombres d'œufs, à un facteur de proportionnalité près, auxquels les méthodes statistiques (tests de Student, ANOVA, GLM, tests de rangs...) sont insensibles. La calibration de la taille moyenne des œufs (pente égale à un) est nécessaire uniquement si c'est le nombre absolu d'œufs qui est étudié.

Il est à noter que les photos utilisées dans ce test ne sont pas totalement optimales : il est très facile, par exemple, d'utiliser un fond de couleur plus contrastée (par exemple, du post-it® fluo) pour améliorer encore les performances.

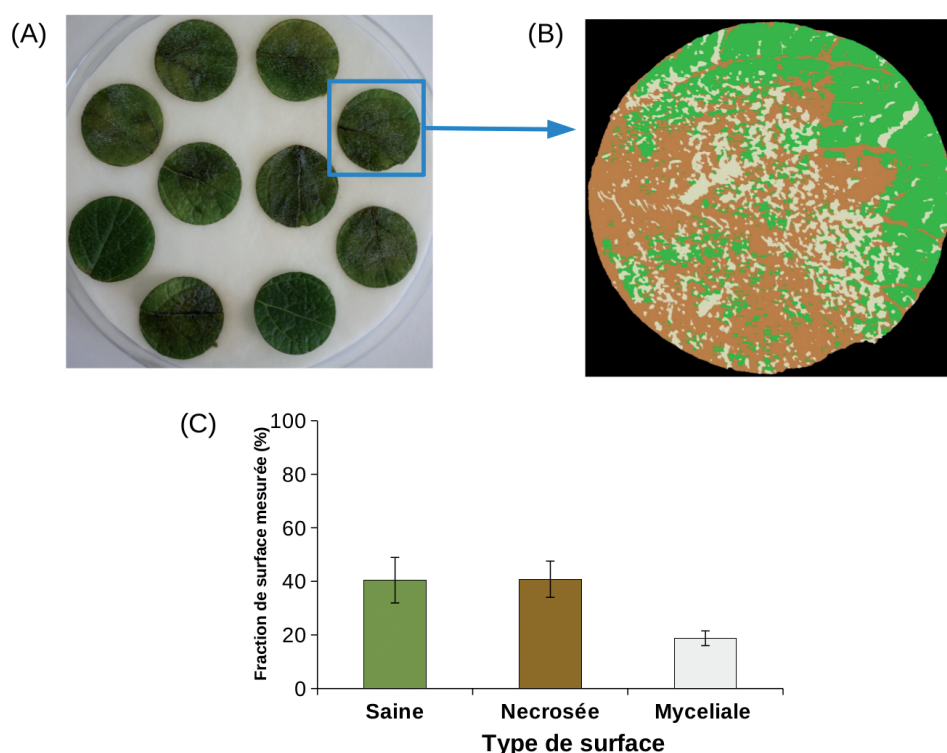
## Extensions possibles et autres applications

La méthode présentée ici se prête à de nombreuses extensions. Par exemple, nous pouvons utiliser les images colorisées produites comme base pour des analyses d'images plus pointues (distribution des œufs parasités dans l'espace, mesure d'index d'agrégation...).

La méthode de segmentation par analyse discriminante mise en œuvre par CODICOUNT peut, en outre, avoir une utilité bien au-delà du contexte du parasitisme par *Trichogramma*. Ainsi, les œufs hôtes d'*Ephesttia kuehniella* sains ont tendance à se dégrader avec le temps. Ces changements de qualité s'accompagnent de changements d'aspect et de couleur : les œufs dégradés jaunissent progressivement. CODICOUNT peut directement être utilisé dans ce cas en utilisant la zone P pour les œufs dégradés, au lieu des œufs parasités. CODICOUNT peut alors servir à quantifier le niveau de qualité des œufs.

De façon générale, la méthode peut s'appliquer à d'autres espèces de parasitoïdes oophages et d'autres espèces hôtes. En fait, tout cas de figure dans lequel il s'agit de différencier trois types de zones sur la base de leur couleur se prête à cette analyse. Par exemple, nous avons utilisé CODICOUNT pour mesurer automatiquement la fraction de surface de disques foliaires saine, nécrosée, ou bien recouverte de mycélium de *Phytospora infestans*. Dans ce contexte, la zone B a été utilisée pour le mycélium (zones blanches), la zone H pour les portions de feuilles saines, et la zone P pour les portions de tissus nécrosés (Figure 6). La calibration de taille n'est pas utilisée, car

ce sont les pourcentages de surface (et donc les nombres de pixels dans le tableau de résultats) qui sont pertinents afin d'obtenir une mesure objective et quantitative du niveau d'infection.



**Figure 6.** Utilisation de CODICOUNT pour quantifier l'effet anti-oomycète d'une protéine sur le pathogène *Phytophthora infestans*. Des disques de 2 cm de diamètre de feuilles de pomme de terre ont été inoculés avec 50  $\mu$ L d'une solution de la protéine et, 24 h après, 20  $\mu$ L d'une suspension *P. infestans*. Sept jours après des photos ont été prises (A) pour mesurer, avec CODICOUNT, le développement de l'infection (B) image après traitement (C) résultats).


## Conclusions

En termes de temps de comptage, il faut de 15 à 20 min pour compter manuellement les œufs sur une de nos bandelettes, alors qu'il faut environ 5 min pour calibrer CODICOUNT, après quoi le comptage des images est quasiment instantané. Cette méthode permet donc un gain de temps significatif par rapport à la méthode manuelle.

Le comptage manuel d'un grand nombre de photos représente un temps de travail énorme, ce qui, en outre, peut induire des erreurs non négligeables. Avec CODICOUNT, la macro peut être appliquée sur un nombre d'images illimité, et chaque image sera comptée exactement de la même manière. Ceci, plus la possibilité de garder trace de la macro de comptage, et ainsi de pouvoir refaire les comptages à la demande, permet une meilleure traçabilité des travaux. Par ailleurs, par sa rapidité cette méthode ouvre la possibilité d'atteindre des volumes de données plus importants, par exemple en effectuant plus de réplicats, ou en faisant plus de points dans le temps lors de suivis temporels. *In fine*, ceci permet de conduire des expériences avec une plus grande puissance statistique.

## Références bibliographiques

Bigler F (1994) *Quality control in Trichogramma production*. In : Biological Control with Egg Parasitoids (Wajnberg E, Hassan S A, eds). CAB International, Wallingford, UK.



Consoli F, Fernando L, Parra J, Zucchi RA (2010) *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma*. Springer Science & Business Media.

Daumal J, Voegelé J, Brun P (1975) Les Trichogrammes 2 : unité de production massive et quotidienne d'un hôte de substitution *Ephesia kuehniella* ZELL. (*Lepidoptera, Pyralidae*). *Ann Zool Ecol Anim* **7** : 45-59.

Grieshop MJ (2005) Evaluation of three species of *Trichogramma* egg parasitoids for the biological control of the indian meal moth in retail stores and warehouses. PhD thesis, Department of Entomology, College of Agriculture Kansas State University Manhattan, Kansas.

Hawltzky N (1992) La lutte biologique à l'aide de trichogrammes. *Courrier Environ INRA* **16** : 1-17.

Morel-Journel T, Girod P, Mailleret L, Auguste A, Blin A, Vercken E (2015) The highs and lows of dispersal : how connectivity and initial population size jointly shape establishment dynamics in discrete landscapes. *Oikos* doi :10.1111/oik.02718.

Nixon M, Aguado MS (2012) *Feature extraction and image processing for computer vision*. Academic Press.

Pinto D, Stouthamer R (1994) Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. E. Wajnberg E, Hassan SA (eds.), *Biological control with egg parasitoids*. CAB International, Wallingford : 1-28.

R Core Team (2015) R : A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al. (2012) Fiji : an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9** : 676-682.

Schneider C, Rasband W S, Eliceiri KW (2012) NIH Image to Image J : 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9** : 671-675.

