

## Détection semi-automatique de cellules de fruits charnus observés par microscopie confocale 2D et 3D

David Legland<sup>1</sup>, Marie-Françoise Devaux<sup>2</sup>

**Résumé :** *Les propriétés mécaniques et sensorielles des fruits charnus tels que la pomme ou la tomate sont étudiées en regard de la taille, de la forme, et de l'organisation spatiale des cellules des tissus constituant le fruit. La microscopie confocale permet d'observer les cellules en 2 ou 3 dimensions et l'analyse d'images offre des outils pour décrire la structure cellulaire en mesurant rapidement des paramètres morphologiques variés (taille, forme, orientation...) sur les cellules. Pour mesurer ces paramètres de manière automatique, il est d'abord nécessaire de détecter précisément l'emplacement des cellules et/ou leurs contours. La méthode proposée ici est une chaîne de traitements d'images dont l'objectif est d'identifier les cellules dans des images microscopiques 2D ou 3D. La chaîne de traitement se décompose en une procédure automatique de recollage des images pour agrandir le champ de vue, une étape de filtrage directionnel de l'image pour mettre en valeur les parois tout en réduisant le bruit, et une étape de segmentation qui délimite les contours de chaque cellule. Les différents traitements ont été implémentés sous la forme de fonctions Matlab. Afin de faciliter leur manipulation, des interfaces graphiques conviviales ont été créées. De plus, une attention particulière a été portée à l'automatisation des traitements, afin de traiter des collections d'images avec les mêmes paramètres.*

**Mots clés :** Structure cellulaire, analyse d'images, morphologie mathématique, ligne de partage des eaux, filtrage directionnel, collections d'images

### Introduction

Les fruits charnus tels que la pomme ou la tomate ont un grand intérêt économique du fait de leur large consommation. Leurs propriétés mécaniques (résistance aux chocs, fermeté...) ainsi que sensorielles (croquant, jutosité...) dépendent en grande partie de la composition physico-chimique au sein du fruit, mais la structure cellulaire des différents tissus semble aussi jouer un rôle. Cette structure cellulaire peut être décrite par la taille, la forme, et l'organisation spatiale des cellules constituant les différents tissus. Notre objectif est de quantifier cette structure cellulaire à partir d'images numériques de tissus végétaux. Pour cela, la première étape est d'identifier les différentes cellules dans les images.

La microscopie confocale est couramment utilisée pour observer les tissus végétaux. Pour des fruits tels que la tomate ou la pomme, le diamètre des cellules peut atteindre 1 mm (Devaux *et al.*, 2008).

---

<sup>1</sup> Inra UMR782 Génie et Microbiologie des procédés alimentaire - GMPA - 78850 Thiverval-Grignon  
☎ 01 30 81 52 54 ✉ [David.Legland@grignon.inra.fr](mailto:David.Legland@grignon.inra.fr)

<sup>2</sup> Inra UR1268 Biopolymères, interactions assemblages – URBIA – 44316 Nantes

Sur une image en grossissement  $\times 10$ , on observe plusieurs cellules, ainsi que d'éventuels espaces intercellulaires (**figure 1**). Par l'acquisition de plusieurs plans optiques, on accède en partie à la structure 3D des cellules (Gray, 1999).

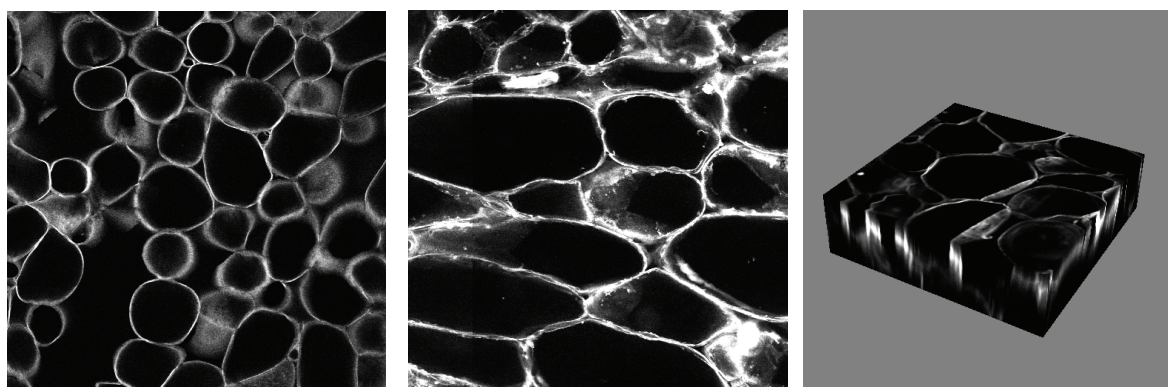
En revanche, les variations de la structure cellulaire en fonction de la position dans le fruit sont en général peu visibles du fait de la faible étendue du champ de vue. De plus, peu de cellules sont entièrement visibles dans les images 3D : dans le cas de la tomate, l'épaisseur visible est au mieux de  $200\ \mu\text{m}$ , ce qui est nettement insuffisant pour observer les plus grandes cellules.

L'analyse automatique d'images 2D ou 3D à l'aide de logiciels spécialisés donne rapidement un grand nombre de paramètres décrivant la morphologie des cellules (taille, forme, orientation...). La mesure de ces paramètres nécessite tout d'abord d'identifier dans l'image quels sont les pixels (*picture element*) ou voxels (*volume element*, équivalent des pixels pour les images 3D) qui appartiennent aux cellules, à leurs parois ou aux espaces intercellulaires. Cette identification, appelée *segmentation* de l'image, repose sur une chaîne de traitement d'images, comprenant plusieurs étapes.

Dans le cas des fruits charnus, trois étapes ont nécessité des développements spécifiques. Tout d'abord, afin de mieux appréhender l'organisation cellulaire, plusieurs images ont été recollées sous la forme d'images mosaïques afin d'augmenter le champ de vue.

Classiquement, la segmentation des images est réalisée par seuillage des niveaux de gris. Cette procédure nécessite un contraste homogène entre cellules et parois ce qui n'est généralement pas le cas. Une solution alternative et très performante consiste à utiliser la procédure de *ligne de partage des eaux*, un outil issu de la morphologie mathématique particulièrement adapté aux matériaux cellulaires. La méthode étant très sensible au bruit contenu dans les images, une étape de filtrage est souvent nécessaire. Dans le cas des tissus végétaux, les parois ont une épaisseur très fine comparable à la dimension du bruit. Un *filtrage directionnel* des images est proposé pour éliminer le bruit tout en préservant les parois.

L'ensemble de ces outils a été mis au point sous Matlab® (The MATHWORKS, USA), ou sous la forme d'exécutable, avec l'objectif d'être générique : application à des images de différents tissus, en 2D ou en 3D. Des *interfaces utilisateur* conviviales ont été développées pour faciliter leur utilisation.



**Figure 1** : acquisitions d'images : de pomme (à gauche) et de tomate (au centre). Le champ de vue de chaque image était de  $1,28\ \text{mm}$  de côté. A droite, représentation d'une pile d'image 3D

## 1. Echantillons

### 1.1 Préparation des coupes

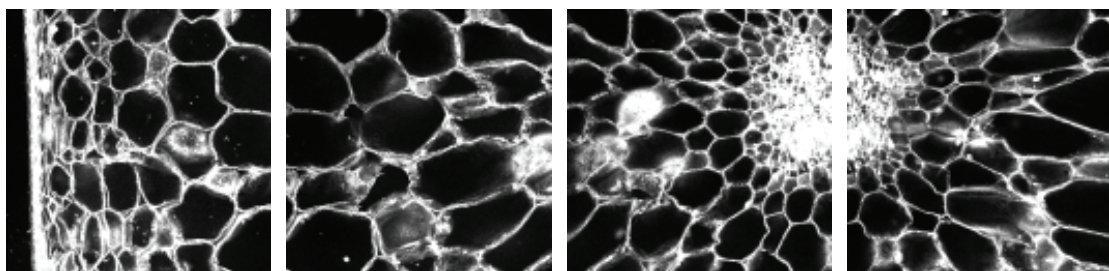
Des images exemples de pomme et de tomate sont utilisées pour illustrer les traitements. Le même protocole d'acquisition d'images a été utilisé pour les pommes et les tomates. Des prélèvements cylindriques sont effectués dans les fruits à l'emporte-pièce (diamètre 15 mm). La manière dont les cylindres sont prélevés dépend de l'information recherchée (position ou orientation dans le fruit). Dans cet article, l'analyse d'image est présentée pour une image de pomme acquise dans la région équatoriale du fruit, et pour une image de tomate acquise à une position choisie aléatoirement à la surface. Dans les deux cas, l'image est perpendiculaire à la surface du fruit. Une coupe d'une épaisseur de 200 microns pour la pomme et de 400 microns pour la tomate, a été prélevée dans chaque cylindre, en utilisant un microtome à lame vibrante (MICROM, HM 650 V). Chaque coupe a été colorée à l'orangé d'acridine, puis rincée à l'eau.

### 1.2 Acquisition des images

Les images ont été acquises avec un microscope confocal Zeiss LSM410 équipé d'un objectif à air  $\times 10$  avec une ouverture numérique de 0,5. L'épaisseur de la section optique dans ces conditions est de 7,5  $\mu\text{m}$ . La longueur d'onde d'excitation était de 488 nm, et la lumière émise à des longueurs d'onde supérieures à 515 nm a été collectée en utilisant un filtre passe long. Le microscope permet de numériser chaque image sous la forme d'un tableau de pixels de taille 512  $\times$  512, avec des niveaux de gris codés entre 0 (noir) et 255 (blanc). La résolution était de 2,5  $\mu\text{m}$ , ce qui correspond à des images de 1,28  $\times$  1,28 mm. Dans le cas des tomates, plusieurs coupes optiques, distantes de 7,5  $\mu\text{m}$  sur l'axe vertical, ont été acquises successivement pour former des piles d'images 3D.

## 2. Recollage des images

Afin d'observer une zone de tissu plus large que le champ de vue du microscope, plusieurs images se recouvrant légèrement ont été acquises (**figure 2**). Le décalage entre deux images n'étant pas connu de manière précise, le recollage des différentes images est problématique.



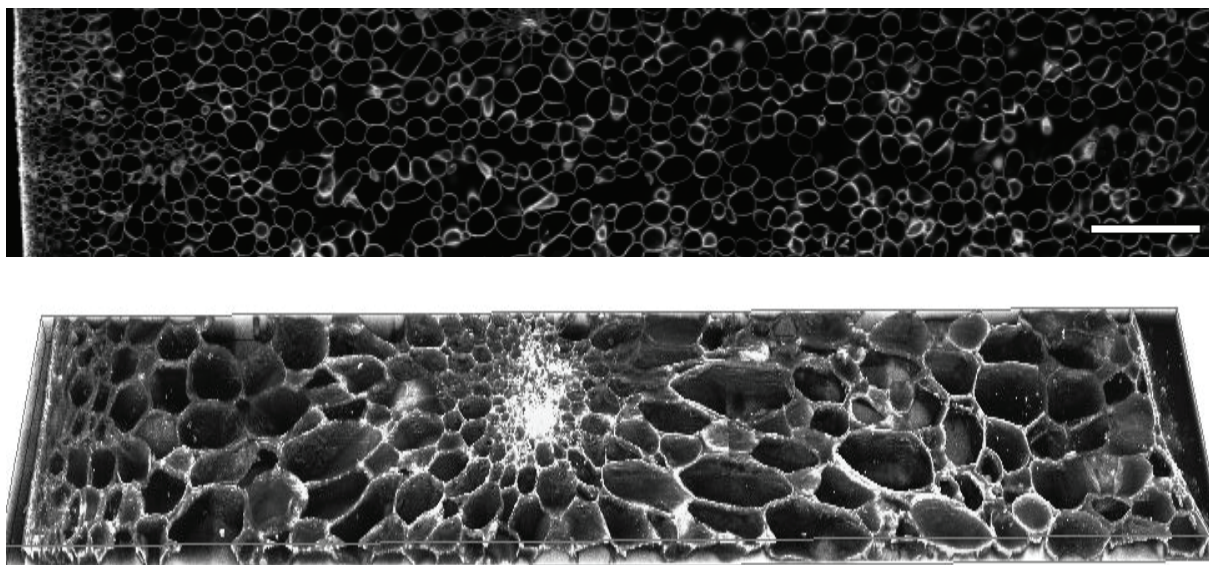
**Figure 2** : images de tomate acquises avec un recouvrement d'environ 15 % dans la direction horizontale. Les images font 1,28 mm de côté

Les méthodes de recalage d'images se basent soit sur un ensemble de points identifiés manuellement, soit sur une mesure de similarité (corrélation) entre deux régions de l'image. La plupart de ces outils n'existent que pour les images 2D. Un logiciel spécifique a donc été développé pour recoller des séries d'images, fonctionnant à la fois en 2D et en 3D (Fromont, 2005). Il est composé de deux parties distinctes : la première calcule les vecteurs de translation à appliquer à chaque image ou pile d'images, tandis que la seconde produit une

image mosaïque (ou une pile d'images) qui est la réunion des images (ou des piles d'images) d'entrée translattées par les vecteurs correspondants.

Le vecteur de translation est calculé en minimisant la somme des carrés des différences entre les régions superposées de deux images adjacentes. Pour réduire les temps de calcul, une approche pyramidale est utilisée : le décalage est d'abord estimé sur une version filtrée et réduite en taille des images, puis il est ajusté en utilisant des images de plus en plus résolues.

Il est ainsi possible d'obtenir des images couvrant un champ de vue plus large que celui du microscope et d'observer, par exemple, l'évolution de la structure cellulaire en fonction de la position dans le fruit. Pour la pomme et la tomate, les variations en fonction de la distance à l'épiderme sont particulièrement informatives.



**Figure 3** : images mosaïques de pomme (en haut) et de tomate (en bas).

*L'épiderme du fruit est à gauche dans chaque cas.*

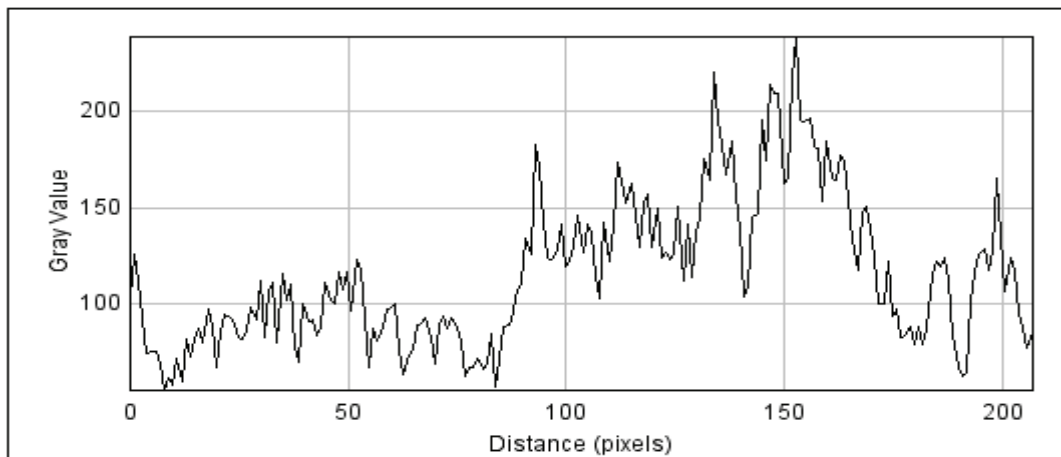
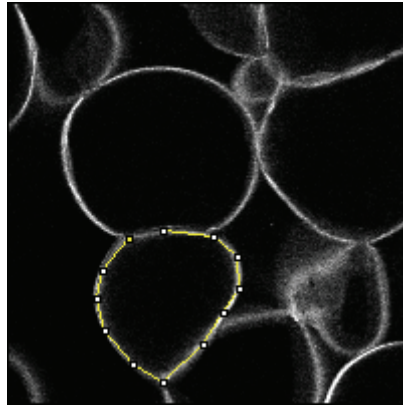
*L'image de pomme fait  $11,17 \times 2,30$  mm et l'image de tomate  $7,63 \times 1,28 \times 0,15$  mm.*

La **figure 3** montre le résultat de la création d'images mosaïques pour la pomme et la tomate. L'image de pomme est le résultat d'un double recollage : horizontal et vertical. Les images montrent une forte hétérogénéité dans la taille, la forme et l'orientation des cellules. Dans les deux images, les cellules situées près de l'épiderme sont plus petites. Dans la tomate, les cellules sont plus grosses et allongées radialement dans la partie centrale du péricarpe. Les cellules de l'épiderme externe (à gauche) semblent aplaties parallèlement à l'épiderme. Au centre du péricarpe, on distingue un faisceau de cellules constituées d'un grand nombre de petites cellules et qui oriente localement les cellules en étoile. Dans le cas de la pomme, on observe de nombreux espaces intercellulaires, dont la taille peut être aussi importante, voire plus importante, que celle des cellules.



### 3. Filtrage directionnel

Dans les images de microscopie, la détection automatique des objets, ici les parois des cellules, est perturbée par la présence de bruit : le fond des cellules n'est pas uniformément noir et les pixels des parois ont des valeurs qui varient beaucoup (**figure 4**). L'objectif du filtrage est d'améliorer l'image des parois en fermant les contours, tout en lissant l'intérieur des espaces cellulaires et intercellulaires.



**Figure 4 :** mesure du profil de niveaux de gris sur le contour d'une cellule de pomme.

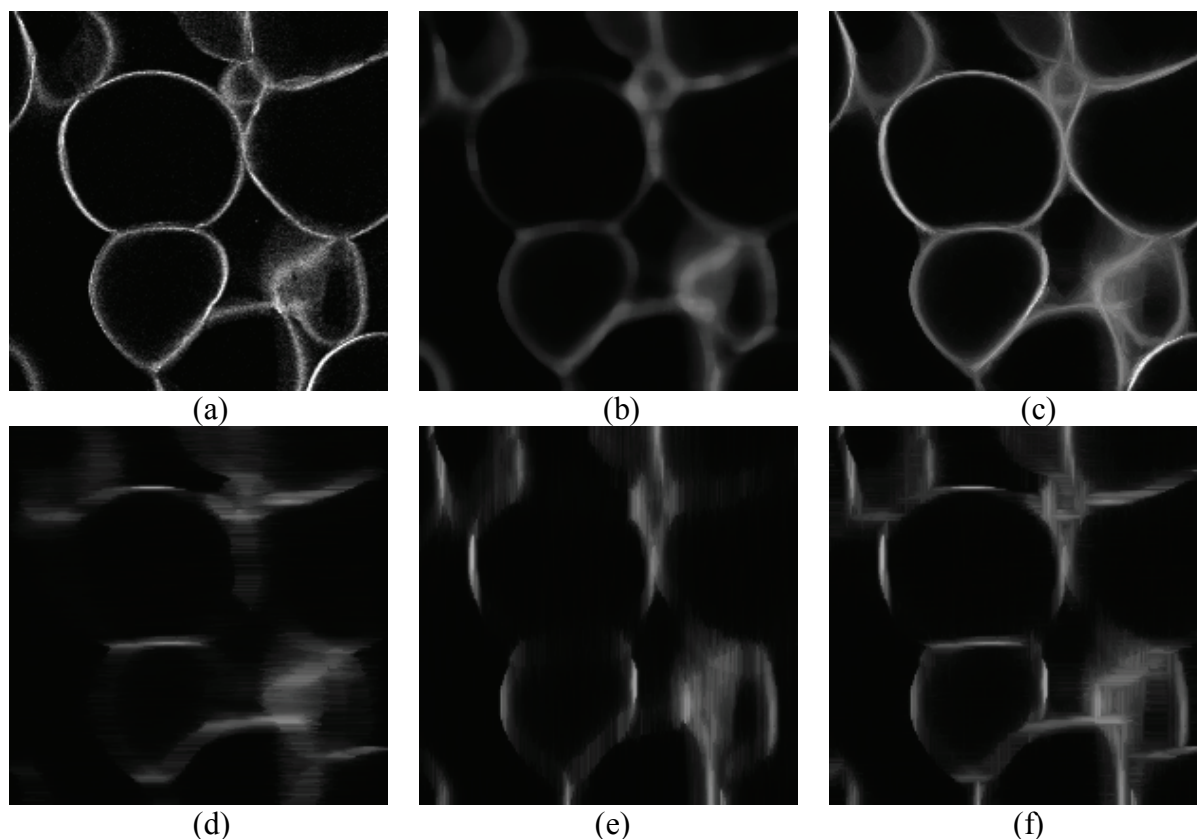
La démarche classique du filtrage d'image est de considérer pour chaque pixel, les pixels situés dans un voisinage proche et de calculer la valeur moyenne, médiane ou une moyenne pondérée des niveaux de gris des voisins (Cocquerez, 2000). Le voisinage pris en compte est défini par un élément structurant de taille et de forme donnée : disque, carré, ou noyau gaussien. Le problème qui se pose dans le cas des images de cellules est que les parois sont relativement fines (quelques pixels d'épaisseurs), et qu'un filtrage avec un élément structurant classique les atténue fortement, voire les supprime (**figure 5-b**). Il est donc nécessaire d'utiliser un filtrage tenant compte de la forme des parois et de leur orientation locale dans l'image.

Le filtrage directionnel nécessite des éléments structurants non isotropes. Les filtres de Gabor sont par exemple très utilisés pour la reconnaissance d'empreintes digitales (Hong *et al.*, 1998). Nous avons choisi comme éléments structurants des segments de droite de taille fixe,

mais d'orientation variable, qui sont plus simples à manipuler. La longueur des segments de droite est choisie pour être supérieure à deux fois l'épaisseur visible d'une paroi, soit 25 pixels dans l'exemple de la **figure 5**.

De tels filtres directionnels sont souvent utilisés avec des ouvertures morphologiques (Aufrichtig et Wilson, 1992, Terol-Villalobos *et al.*, 2008). Dans notre cas, l'application d'une ouverture morphologique laissait des « trous » dans les parois, ce qui posait des problèmes lors de la phase ultérieure de segmentation. Un filtre médian a donc été préféré, afin de garder la forme des parois tout en bouchant les trous.

La **figure 5** montre que pour une orientation donnée du masque, seules les parois orientées dans la même direction que le segment de droite sont préservées et les autres sont éliminées comme du bruit (**figure 5-d, 5-e**). En prenant la valeur maximum des niveaux de gris observés pour les orientations horizontales et verticales, on obtient une image avec les parties horizontales et verticales des parois (**figure 5-f**). En considérant 16 orientations et en retenant la valeur maximale observée selon les 16 directions, les parois des cellules sont préservées et lissées (**figure 5-c**). Un filtrage moyenneur avec un élément structurant plat carré de 3 pixels de côté est ensuite ajouté afin de lisser le résultat du filtrage directionnel.



**Figure 5** : cellules de pomme.

*1<sup>ère</sup> ligne de gauche à droite : image d'origine, filtrage médian avec un masque carré 10×10, et filtrage directionnel combinant 16 directions.*

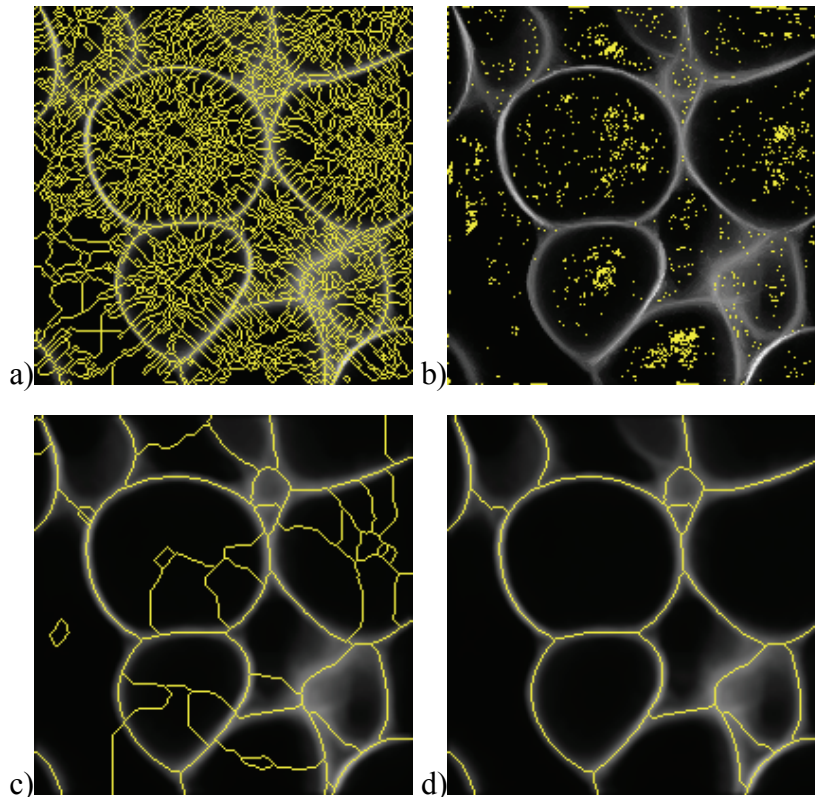
*2<sup>ème</sup> ligne : filtrage médian avec un masque ligne horizontale, ligne verticale, filtrage directionnel combinant les directions horizontale et verticale.*

#### 4. Segmentation par ligne de partage des eaux

Après avoir obtenu une image lissée des parois cellulaires, on cherche à segmenter l'image afin d'identifier les cellules et les espaces intercellulaires. Les algorithmes de segmentation peuvent être classés en deux catégories, selon qu'ils détectent les frontières ou les régions (Cocquerez, 2000). La *ligne de partage des eaux* est un algorithme de détection de régions particulièrement robuste et généraliste issu de la morphologie mathématique (Soille, 2003). Son principe est d'assimiler les niveaux de gris de l'image à des niveaux d'altitude : les minima sont des fonds de vallées ou des bassins versants et la ligne de partage des eaux est l'ensemble des lignes de crête qui délimitent ces bassins.

La ligne de partage des eaux est souvent utilisée sur une image de *contours* obtenue après application d'un *filtre gradient*. Pour des images de cellules végétales, le contraste entre parois et cellules est suffisant pour appliquer la ligne de partage des eaux directement sur les images. Les cellules correspondent à des minima de l'image et les parois à des crêtes de l'image.

L'application directe de la ligne de partage des eaux sur une image génère cependant un grand nombre de régions très petites (**figure 6-a**). Ce phénomène de *sur-segmentation* provient de l'existence de nombreux minima locaux dans l'image qui ne correspondent pas aux minima désirés, mais au bruit de fond dans l'image (**figure 6-b**). Le lissage améliore ce résultat, mais n'élimine pas tous les faux minima (**figure 6-c**). Il est donc nécessaire de détecter les minima significatifs. Une possibilité est de pointer manuellement un minimum pour chaque région, mais le grand nombre de cellules et la difficulté à manipuler des images 3D ne rendent pas cette solution optimale.



**Figure 6** : ligne de partage des eaux sur l'image de la figure 5, et minima locaux en bas, ligne de partage des eaux sur l'image filtrée, et après détection des minima étendus

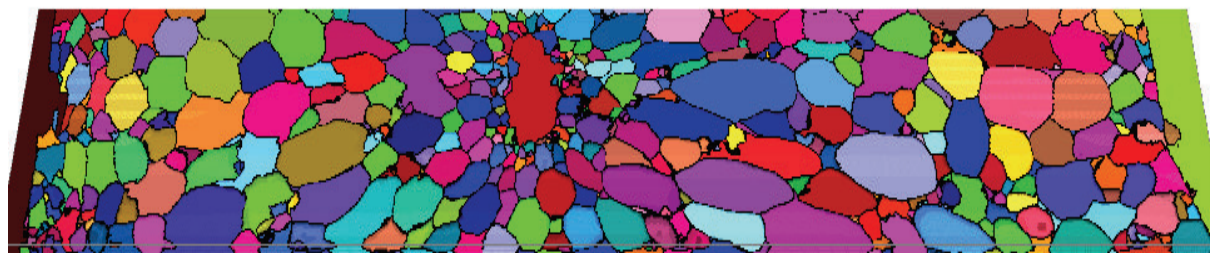
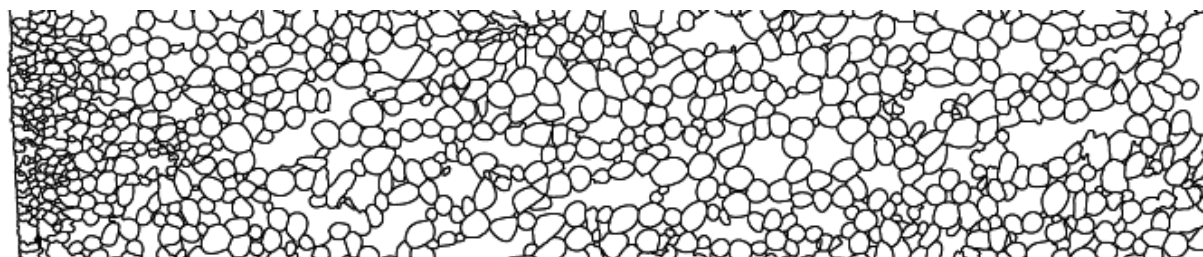
Nous avons utilisé une détection automatique des minima basée sur les « minima étendus » (Soille, 2003). Les minima ont été filtrés selon leur *dynamique de niveaux de gris* : si on considère les niveaux de gris comme des altitudes, un chemin (suite de pixels voisins) joignant deux minima doit « remonter », et passer une crête avant de redescendre. La dynamique d'un minimum est la plus petite valeur de remontée nécessaire pour atteindre un autre minimum. Le résultat donne pour chaque minimum l'ensemble des pixels dont la hauteur est inférieure à la hauteur du minimum plus la dynamique.

Seuls les minima dont la dynamique était supérieure à un certain seuil ont été gardés pour les images : 10 pour la tomate, 15 pour la pomme. La valeur de ce seuil a été déterminée empiriquement à partir d'une sélection d'images de test : un seuil plus petit produisait plus de région, un seuil plus grand avait tendance à fusionner les cellules. Pour les images de pomme, on obtient ainsi une segmentation correcte (**figure 6-d**).

Pour les images 3D de tomate, quelques traitements ont été rajoutés pour filtrer l'image des minima : une fermeture morphologique directionnelle pour supprimer les trous dans les minima (segments 21 pixels de longs dans 16 directions différentes), suivie d'une ouverture morphologique directionnelle de même taille pour diviser les régions correspondant à plusieurs cellules. La ligne de partage des eaux a ensuite été appliquée en imposant les minima étendus filtrés. Les frontières de chaque cellule sont ainsi précisément détectées (**figure 7**).



**Figure 7** : portion d'une image mosaïque 3D, détection des minima 3D et résultat de la ligne de partage des eaux



**Figure 8** : résultat de la procédure complète (recollage, filtrage directionnel et segmentation par ligne de partage des eaux) sur les deux images témoins de pomme (en haut) et de tomate (en bas).

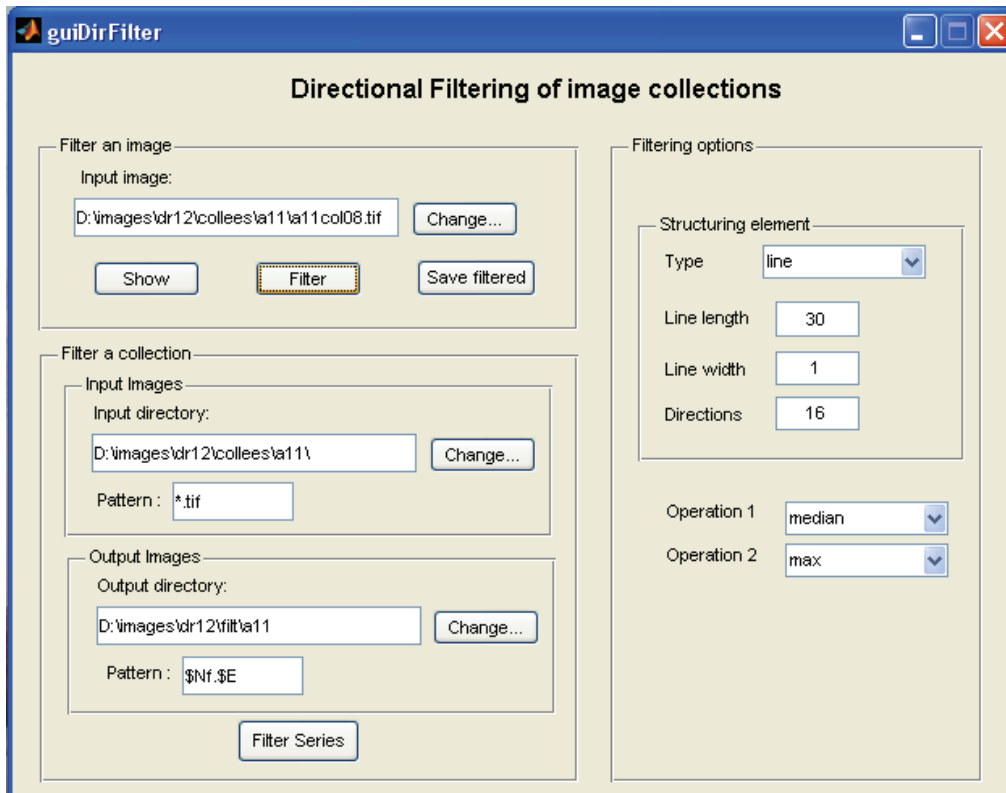


## 5. Résultats

Après avoir recollé les images, filtré les niveaux de gris des parois et appliqué la ligne de partage des eaux, on obtient des images 2D ou 3D qui délimitent différentes régions (**figure 8**). Dans le cas des images de pomme, on distingue clairement les cellules et les espaces intercellulaires.

L'utilisation conjointe du filtrage directionnel et de la ligne de partage des eaux donne une segmentation relativement correcte des images. Les limites du traitement apparaissent dans les zones contenant des petites cellules, notamment près des épidermes ou autour des faisceaux de cellules.

Les images de tomates montrent plus de défauts de segmentation. La première raison est que la qualité des images 3D de microscopie confocale diminue très vite avec la profondeur ce qui nécessite d'être plus tolérant vis-à-vis des marges d'erreur. La deuxième raison est que les tomates observées étaient à un stade mature et que des cellules commençaient à se dégrader, ce qui rend difficile leur coupe et leur observation.



**Figure 9** : *exemple d'interface graphique développée pour l'utilisation de la procédure de filtrage directionnel. Les différentes zones de l'application permettent de régler les paramètres du filtre (taille de l'élément, opérations à appliquer...), de charger et filtrer une image simple, et d'appliquer le traitement sur une collection d'images en gardant les mêmes options de traitement*

## Conclusion et perspectives

La microscopie confocale permet d'observer la structure cellulaire des fruits charnus et des tissus végétaux en général. La segmentation automatique des cellules dans les images présente cependant des difficultés. Nous avons développé des outils pour traiter des problèmes récurrents dans le

traitement des images de cellules végétales : recollage des images pour augmenter la taille du champ de vue, amélioration des parois et réduction du bruit par filtrage directionnel, segmentation des cellules par ligne de partage des eaux, avec détection des minima par filtrage morphologique. Ces traitements sont nécessaires afin de pouvoir identifier les cellules et les espaces intercellulaires dans les tissus et quantifier la structure cellulaire.

Les traitements ont été développés pour réaliser une segmentation automatique des images. L'ajustement des paramètres (longueur et nombre de direction des lignes dans le filtrage directionnel, seuil de détection des minima ou taille de filtrage des minima dans la ligne de partage des eaux) dépend de la taille des objets dans l'image. Un étalonnage préalable avec un petit nombre d'images peut être nécessaire avant d'appliquer la méthode à une collection d'images.

Les outils sont génériques et adaptables à d'autres types de structures ayant une morphologie similaire. Des interfaces graphiques conviviales ont été développées afin de permettre leur utilisation par des utilisateurs non informaticiens (**figure 9**). Ces interfaces prévoient en outre le traitement par lot d'une série d'images acquises selon les mêmes modalités.

## Bibliographie

- Cocquerez J-P., Philipp S. (2000) *Analyse d'images : filtrage et segmentation*. Masson
- Aufrichtig R., Wilson D.L. (1992) "Marking Arteries and Catheters in X-Ray Fluoroscopy Using Morphological Filtering," *Proc. IEEE EMBS*
- Devaux M-F., Bouchet B., Legland D., Guillon F., Lahaye M. (2008) Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 99-109
- Fromont L., Devaux M-F, Barba D. (2005) Three-dimensional assembling of confocal images using multiresolution pyramids. In *Proc. 9th European Congress for stereology and image analysis*, 10-13 May 2005, Zakopane (Poland)
- Gray J.D., Kolesik P., Hoj P.B., Coombe B.G. (1999) Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue. *Plant J* 19: 229-236
- Hong L., Wan Y., Jain A. 1998 Fingerprint image enhancement: algorithm and performance evaluation, *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intel.*, 20, 777-789
- Luengo Hendriks C.L., van Vliet L.J. (2003) Discrete morphology with line structuring elements, in: N. Petkov, M.A. Westenberg (eds.), *Computer Analysis of Images and Patterns – CAIP* (Proc. 10th Int. Conf., Groningen, NL, Aug.25-27), Lecture Notes in Computer Science, vol. 2756, Springer Verlag, Berlin, 2003, 722-729
- Najman L., M. Schmitt M. (1996) Geodesic saliency of watershed contours and hierarchical segmentation. Dans *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 18, (12) 1163-1173
- Soille P., Talbot H. (2001) Directional Morphological Filtering, *IEEE Trans. Pattern Anal Machine Intel.* 23 (11): 1313-1329
- Soille P. (2003) *Morphological Image Analysis*. Springer, 2<sup>nd</sup> edition
- Terol-Villalobos I., Morales-Hernandez L. A., Herrera-Ruiz G. (2008) Directional structures detection based on morphological line-segment and orientation function, in *Discrete Geometry for Computer Imagery*, Springer-Verlag Berlin, LNCS: 458-469
- Vincent L., Soille P. (1991) Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations, dans *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 13, (6) 583-598