

Association d'un microscope à un système de capture d'image

Analyse d'images par le logiciel ImageJ

Christel Le Bon¹, Céline Boulard¹, Pascale Jolivet¹

Résumé : Nous décrivons une méthode actualisant un ancien microscope de bonne qualité pour l'acquisition d'images numériques à moindre coût, et parallèlement nous présentons quelques possibilités offertes par le logiciel libre ImageJ® pour l'analyse d'images comme les mesures de diamètre et de surface (cercle, ovale,...) et pour l'obtention d'histogrammes de population. L'équipement décrit peut être installé sur tout microscope possédant une optique en bon état.

Mots Clés : Logiciel libre, outil graphique, microscopie

Introduction

Une des problématiques développées dans l'unité de Chimie biologique du centre Inra de Versailles-Grignon, concerne les modes d'organisation et de remplissage des organites de réserve dans les graines oléagineuses (Roux E., Baumberger S. *et al.*, 2004 ; Jolivet P., Tailliant K. *et al.*, 2006) et dans des levures modèles (*Yarrowia lipolytica* ou *Saccharomyces cerevisiae*). Ces corps lipidiques, aussi appelés oléosomes dans les graines, sont composés d'un cœur de lipides neutres (triglycérides) entouré d'une couche de phospholipides et de protéines intégrales (majoritairement des oléosines). La taille des oléosomes (de 0,45 à 2 µm) varie en fonction de la variété végétale (Tzen J.T.C., Cao Y.-Z. *et al.*, 1993), de paramètres extérieurs (mode de préparation, présence de cations divalents) et également du stade physiologique de la graine (remplissage, germination). La microscopie à champ clair se révèle donc être une technique rapide pour suivre l'évolution de taille de ces objets.

1. Mise au point de l'installation microscope/caméra

Le financement d'un microscope associé à un système d'acquisition d'images numériques peut être problématique, car cela ne correspond ni à de l'équipement lourd ni à du petit matériel. Une solution intermédiaire consiste à conserver le microscope existant pour ne financer que la partie numérique. Notre objectif était d'actualiser pour la capture d'images numériques un microscope Zeiss (Standard 14) datant des années soixante-dix qui a toujours été bien entretenu et dont les optiques sont en excellent état. Cet appareil permettait déjà la prise d'images via un appareil photo argentique. Pour moderniser cet équipement à un moindre coût avec un système d'acquisition numérique, deux possibilités technologiques s'offraient à nous : un appareil photographique numérique à utiliser en mode manuel en enlevant l'autofocus et nécessitant l'achat d'un logiciel d'acquisition d'image ou une caméra numérique incluant le logiciel d'acquisition. Finalement, notre choix s'est porté sur une caméra numérique Qimaging couleur (moins chère qu'un modèle noir et blanc) possédant un capteur CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) de 3 Mo pixel, moins onéreux qu'un capteur CCD (Charge Coupled Device). Le type de connectique utilisé (port USB2, équipant couramment les ordinateurs fixes et portables) est également un avantage notable. La

¹ UMR 206 Chimie Biologique, UCB INRA Agro Paris Tech - F-78850 Thiverval-Grignon

☎ 01 30 81 54 67 ✉ boulard@grignon.inra.fr

version de base du logiciel de la caméra (Qcapture pro 6.0) gère de manière simple l'acquisition de photos (1 536 × 2 048 pixels, RGB 24). Pour un microscope trinoculaire, l'adaptation de la caméra numérique est effectuée sur le troisième tube via un raccord (**photos 1 et 2**). Il aurait été également possible de fixer la caméra sur le corps binoculaire.



Photo 1 : Microscope Zeiss Standard 14 associé à une caméra Qimaging, capteur CMOS 3 Mo Pixel connecté à un ordinateur portable via un port USB2



Photo 2 : Zoom sur la caméra.

2. Notions sur le logiciel ImageJ

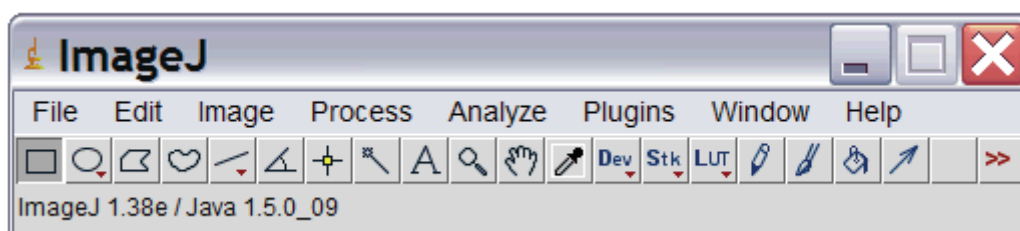


Figure 1 : Barre des menus du logiciel ImageJ

Le logiciel libre ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) est l'adaptation du logiciel NIH Image, développé sous macintosh par le département de Santé mentale du NIH (National Institute of Health). ImageJ se présente en version anglaise, est programmé en Java, et peut être installé sous différents systèmes d'exploitation (Linux, Windows, Mac OS X et 9). Le téléchargement gratuit du logiciel et des multiples plugins se fait sur le site d'ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

ImageJ assure le traitement et l'analyse d'images et il présente des fonctionnalités communes (**figure 1**) à des logiciels commerciaux comme Photoshop. Il est possible de lire différents formats d'images (Tiff, Gif, Jpeg, Avi, ...) et de réaliser des traitements classiques d'image comme l'ajustement des niveaux de gris, de la luminosité et du contraste, des fonctions de

recadrage et de rotation, des traitements mathématiques (conversion en binaire, utilisation de filtres), la modification du code couleur des images ...

ImageJ offre la possibilité de rajouter des plugins développés par des extérieurs (universitaires ou membres de sociétés privées) et téléchargeables sur le site d'ImageJ. Cette variété de plugins et la possibilité de créer des macros combinant plusieurs fonctions permettent d'adapter le logiciel à des besoins précis. Les applications sont multiples ; pour des images de microscopie, mesurer des distances, des surfaces, des contours, dénombrer des objets, pour des gels d'électrophorèse ou des membranes issues de Western blot ou de Dot blot, quantifier l'intensité de bandes ou de spots. Cette liste est loin d'être exhaustive et pour des applications spécifiques, il est préférable de se référer à la liste des plugins disponibles sur le site d'ImageJ ou éventuellement de programmer un plugin en java.

Nous allons illustrer l'utilisation d'ImageJ au travers de deux fonctions couramment utilisées pour l'analyse d'images de microscopie :

- **Measure and Label**, créée par Wayne Rasband du NIH, qui mesure des distances ou des surfaces et les liste pour obtenir un tableau avec l'ensemble des mesures ;
- **Ellipse ROI**, créée par Bob Dougherty, qui délimite des surfaces de type ellipse dont les axes sont mobiles.

3. Exemples d'exploitation du logiciel ImageJ

Les objectifs visés dans nos exemples sont simples. Il s'agit d'une part d'effectuer des mesures de diamètres de corps lipidiques et de déterminer un histogramme de population, d'autre part de mesurer des surfaces de levures.

Dans les deux cas, un calibrage de l'image est nécessaire. Celui-ci est réalisé en prenant une photo d'une lamelle graduée avec l'objectif voulu. Dans le cas de notre microscope, à grossissement 100X, nous avons établi une correspondance de 16,167 pixels/ μm . Cette donnée est introduite dans l'outil « set scale » du menu « Analyze » d'ImageJ. L'intégration de la balle d'échelle en bas à droite de l'image est effectuée grâce à l'outil « scale bar » du menu « Analyze/Tools ».

3.1. Emulsion : détermination des distributions de population.

Des corps lipidiques sont reconstitués par sonication en mettant en présence les différents éléments eau, triglycérides et protéines intégrales. On obtient une émulsion de gouttelettes d'huile dans l'eau et l'observation microscopique est un outil efficace pour observer des phénomènes de coalescence ou des variations de dimension de ces objets en fonction de divers paramètres (volume des phases, concentration ou type de protéines).

La **photo 3**, obtenue par la caméra Qimaging, représente une émulsion huile dans eau observée au grossissement 100X. La cinquième icône en partant de la gauche de la barre des tâches d'ImageJ (« straight line ») permet de tracer le diamètre d'une gouttelette. La mesure du diamètre est faite à l'aide du plugin « **Measure and Label** » qui est présent dans la version de base de ImageJ. Pour chaque mesure, les informations sont retranscrites dans le tableau de résultats (**figure 2**) : numéro de mesure et diamètre en μm . Il est possible d'accumuler les données sur plusieurs photos pour une meilleure étude statistique de la distribution de population.

Une fois toutes les mesures effectuées, il est possible d'obtenir sous ImageJ un histogramme de population de cette émulsion (**figure 3**) avec la fonction « **Distribution** » du menu « Analyse » : soit le paramétrage est réalisé de manière automatique, soit les paramètres sont définis manuellement. Ces paramètres sont les limites inférieures et supérieures de l'histogramme, le nombre de classes (bin en anglais), ce qui fixe alors la largeur de classe (bin width en anglais). Des données complémentaires sont également fournies comme le nombre de mesures, la valeur moyenne et l'écart type.

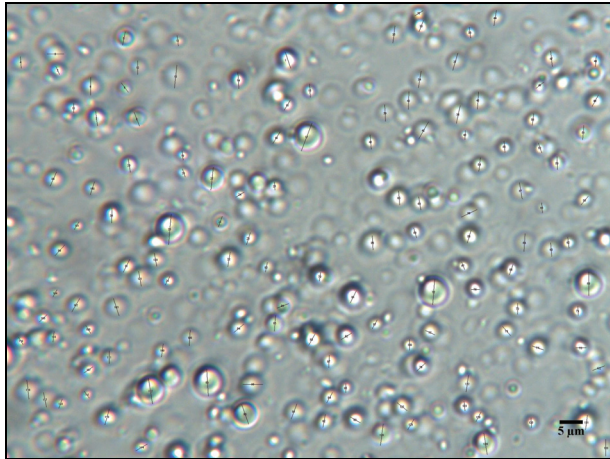


Photo 3 : émulsion huile dans eau observée au 100 X

Numéro de mesure

Diamètre en μm

	Mean	Min	Max	Angle	Length
71	237.993	149.556	255	-88.152	1.965
72	196.298	89.778	255	-94.708	5.478
73	228.174	154.889	255	-48.945	2.601
74	243.299	172.444	255	-18.886	2.537
75	236.911	161.185	255	0	2.219
76	246.286	192.889	255	0	1.877
77	242.780	195.444	255	-24.305	2.176
78	229.369	139.222	255	42.879	2.417
79	246.437	192.333	255	-97.853	1.895
80	219.316	162.296	250.963	-100.620	2.076

Figure 2 : tableau collectant l'ensemble des mesures effectuées sur la photo 3

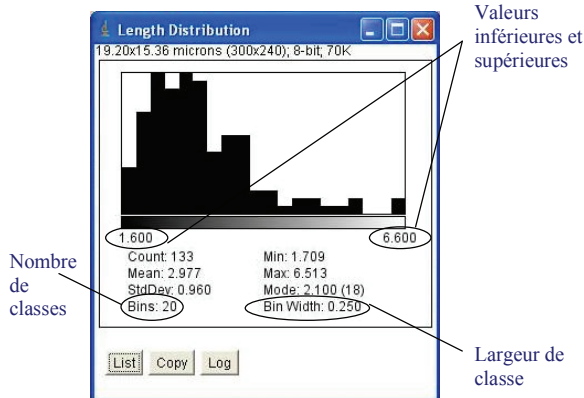


Figure 3 : histogramme issu des mesures de diamètre du tableau de la figure 2

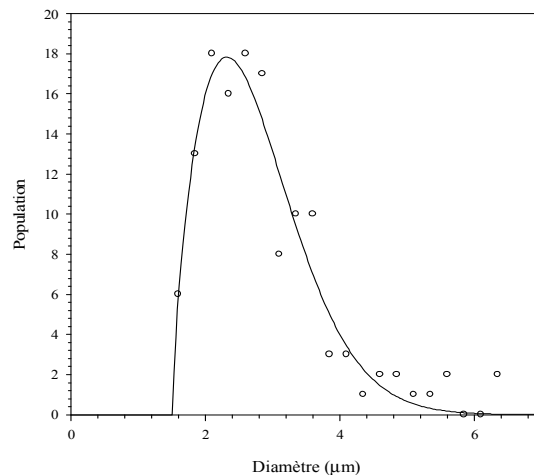


Figure 4 : exploitation de l'histogramme de la figure 3

Les résultats peuvent être finalement transférés vers un tableur (type Excel) ou éditeur scientifique (type Sigma Plot) pour ajuster la distribution par un modèle mathématique (**figure 4**).

3.2. *Yarrowia lipolytica* : détermination des dimensions d'objets (surface).

Des organismes comme les levures *Yarrowia lipolytica* ou *Saccharomyces cerevisiae* présentent des corps lipidiques au sein de leur structure. La **photo 4** est une observation au grossissement 100 X de levures *Yarrowia lipolytica*. Les petits points blancs et gris visibles dans ces organismes correspondent aux corps lipidiques.

Les mesures de surface de ces levures de forme plus ou moins ovale, ne peuvent se faire par l'outil « **Ellipse** » présent dans la barre des tâches d'ImageJ (deuxième icône) car ces organismes ne sont pas forcément situés selon les axes horizontaux et verticaux. Le plugin « **Ellipse ROI** » montre alors son utilité par la formation d'ellipses avec des axes mobiles. Comme ce plugin n'existe pas dans la version de base d'ImageJ, il est nécessaire de le télécharger et de l'ajouter aux autres plugins. Il faut également créer un raccourci (fonction « create shortcut » du menu « Plugins/Shortcuts) qui se présentera comme une icône vide à gauche du pinceau dans la barre des outils de dessin (sélectionner « Drawing tools » à l'aide de l'icône >> dans la barre des icônes). Cela permet d'obtenir une figure circulaire dont on peut ensuite modifier l'épaisseur ainsi que l'orientation. Comme précédemment, les mesures sont réalisées les unes après les autres et comptabilisées dans un tableau (**figure 5**) en utilisant le plugin « **Measure and Label** ». Si l'on veut connaître les dimensions des axes de l'ellipse, il faudra aller dans la fonction « set measurements » pour cocher l'indication « fit ellipse ».

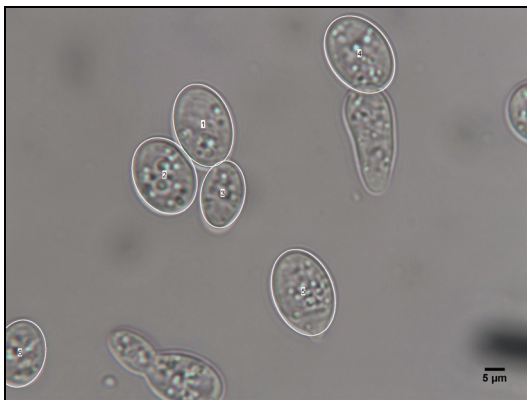


Photo 4 : levures *Yarrowia lipolytica* observées au 100 X

Numéro de mesure	Aire en μm^2			
	Area	Mean	Min	Max
1	259.367	129.736	5	225
2	228.753	126.492	5	219
3	243.900	131.820	70	225
4	254.497	131.593	74	219
5	136.176	124.996	5	217

Figure 5 : tableau collectant les mesures effectuées sur la photo 4



Photo 5 : détail de la photo 4

Levure	Label	Area	fraction
	1	222.278	1
Corps lipidiques	2	1.294	0.006
	3	0.885	0.004
	4	0.778	0.004
	5	1.180	0.005
	6	0.786	0.004
	7	1.290	0.006
	8	1.573	0.007
	9	2.015	0.009

Figure 6 : tableau collectant les mesures de surface et les fractions de surface occupée par des corps lipidiques

ImageJ est un logiciel souple dont les fonctions sont faciles à adapter selon les besoins. Par exemple, quelques modifications dans le fichier `Area_Calculator.java` permettent, à l'aide de la fonction « **Area Calculator** », de mesurer des fractions de surface et non plus des sommes ou des moyennes. Ce plugin modifié est utilisé pour quantifier la surface relative occupée par les corps lipidiques dans une levure (**photo 5**). La surface de la levure étudiée devient l'aire de référence, et les surfaces des corps lipidiques sont pondérées par rapport à celle-ci. Les fonctions « **Ellipse ROI** » (pour définir la surface de référence) et « **Elliptical or Brush Selection** » (pour délimiter les corps lipidiques) sont alors utilisées et les résultats sont rassemblés dans un tableau (**figure 6**).

Conclusion

Nous avons perfectionné un ancien microscope à champ clair pour la prise d'images numériques. C'est à présent un outil utile dans le criblage des facteurs jouant sur la structure et les dimensions de nos objets (émulsion, levure). Il est possible de réaliser un travail de routine de manière autonome avant de solliciter les plateformes de microscopies pour des applications plus spécifiques (épifluorescence, microscopie électronique...). Une adaptation similaire de microscopes ancienne génération non équipés de dispositifs intégrés d'images est envisageable dans la mesure où les éléments d'optique sont en bon état. Le logiciel de domaine public ImageJ appliqué à l'analyse d'images est d'une utilisation aisée pour des applications simples et il présente des fonctionnalités similaires à Photoshop ; néanmoins, pour des applications ciblées, il peut devenir difficile de trouver le plugin adéquat parmi la multitude de petits programmes disponibles sur le site.

Bibliographie

- Jolivet P., Taillart K., *et al.* (2006) Purification and protein composition of oil bodies from *Brassica napus* seeds. *OCL* **13**(6): 426-430
- Roux E., Baumberger S., *et al.* (2004) Oleosins of *Arabidopsis thaliana*: expression in *Escherichia coli*, purification, and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(16): 5245-5249
- Tzen J.T.C., Cao Y.-Z., *et al.* (1993) Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiology* **101**: 267-276
- Site officiel d'ImageJ (programme et plugins téléchargeables) : <http://rsb.info.nih.gov/ij/> (consulté le 20/4/2009)
- ImageJ sur Wikipedia <http://fr.wikipedia.org/wiki/ImageJ> (consulté le 20/4/2009)