

Macrovision et analyse granulométrique en niveaux de gris pour l'analyse histologique de tissus végétaux

Marie-Françoise Devaux¹, Alain Sire¹, Patrice Papineau¹

Résumé : *Les cellules végétales des fruits, des racines et dans une moindre mesure des tiges, sont souvent de très grande taille, jusqu'à 1 mm de longueur dans le cas du péricarpe de tomate. Par microscopie optique, le champ de vue avec un objectif $\times 10$ étant d'environ 1 mm², la caractérisation histologique est difficile. Nous avons développé une approche de quantification à l'échelle macroscopique avec des champs de vue de l'ordre de 1 cm² dans l'objectif de caractériser des surfaces représentatives de tissus végétaux. Un dispositif d'acquisition d'images a été construit comprenant un système d'éclairage, des platines motorisées pour contrôler le positionnement de la caméra et des échantillons. La morphologie cellulaire est quantifiée par analyse granulométrique en niveaux de gris, méthode globale ne nécessitant pas de segmentation des cellules et donnant des informations sur leur taille et leur allongement.*

Mots-clés : Macrovision, tissus végétaux, granulométrie, morphologie mathématique, taille de cellules

Introduction

La structure cellulaire des tissus végétaux est étudiée pour son rôle dans les propriétés d'usage des plantes. Par exemple, la taille des fruits ou de leurs tissus dépend de la taille, de la forme et du nombre de leurs cellules (Cheniclet *et al.*, 2005, Harada *et al.*, 2005). Le contrôle de la qualité des produits nécessite d'établir des liens entre la génétique, la structure et les propriétés des tissus végétaux (Chaib *et al.*, 2007). Pour cela, il est nécessaire d'analyser un nombre représentatif d'échantillons et de quantifier chacune de ces caractéristiques.

Classiquement, les études histologiques sont réalisées à l'échelle microscopique. Dans le cas des organes de stockage - fruits, racines, tubercules - les cellules peuvent être très grandes, jusqu'à 1 mm de longueur dans le cas du fruit de tomate et un petit nombre d'entre elles est visible dans le champ de vue d'un microscope. Afin de réaliser des analyses statistiques, les temps de préparation et d'acquisition des images doivent être minimisés. Dans cet article, nous proposons un système d'acquisition d'images à l'échelle macroscopique dédié à la visualisation de coupes effectuées sur des tissus végétaux frais et sans étapes de coloration ainsi qu'une procédure de traitement des images adaptée au type d'images acquises.

L'analyse histologique comprend la mesure de la taille et de la forme des cellules ainsi que leur arrangement. En microscopie les cellules sont identifiées individuellement et des paramètres morphologiques sont extraits pour chacune d'elle. En macrovision la segmentation de chaque cellule est difficile du fait du manque de résolution pour les plus petites et d'un recouvrement possible de plusieurs couches cellulaires. Nous proposons d'appliquer des méthodes d'analyse de *texture d'images* dont l'objectif est de quantifier les variations locales de niveaux de gris. La présence de petites cellules provoque des variations de niveaux de gris

¹ UR 1268 Biopolymères, interactions assemblages URBIA-INRA, F-44316 Nantes

☎ 02 40 67 51 93 ✉ Marie-Françoise.Devaux@nantes.inra.fr

plus fréquentes que les grandes cellules ce qui induit une texture visuelle plus fine. Il existe de nombreuses méthodes d'analyse de texture d'images (Haralick, 1979, Bharati *et al.*, 2004) basées sur le traitement du signal (transformée de Fourier, en ondelettes), sur des comptages statistiques (méthode des co-occurrences de niveaux de gris, longueur de plage), sur des modélisations de transitions de niveaux de gris (modèle autorégressif, champ de markov), sur des mesures multi résolution (fractal, granulométrie par morphologie mathématique). Si beaucoup de méthodes sont performantes notamment pour classer des images, leur interprétation n'est pas toujours évidente. Parmi les méthodes disponibles, nous avons retenu l'*analyse granulométrique en niveaux de gris* issue du domaine de la *morphologie mathématique* (Soille, 2003) car elle s'interprète directement en termes de taille et de forme des objets observés.

1. Matériels et méthodes

1.1 Préparation des échantillons

L'ensemble du dispositif a été conçu pour observer des tissus végétaux issus principalement de fruits, de racines et de tiges avec une préparation des échantillons la moins lourde possible. Des cubes d'environ 1 cm³ sont prélevés et des coupes d'épaisseur contrôlée sont effectuées directement sur le produit frais à l'aide d'un microtome à lame vibrante². L'épaisseur des coupes est choisie pour minimiser l'observation de couches cellulaires superposées. En pratique, les épaisseurs dépendent de la taille des cellules et du comportement de l'échantillon à la coupe. Elles varient de 75 à 300 µm.

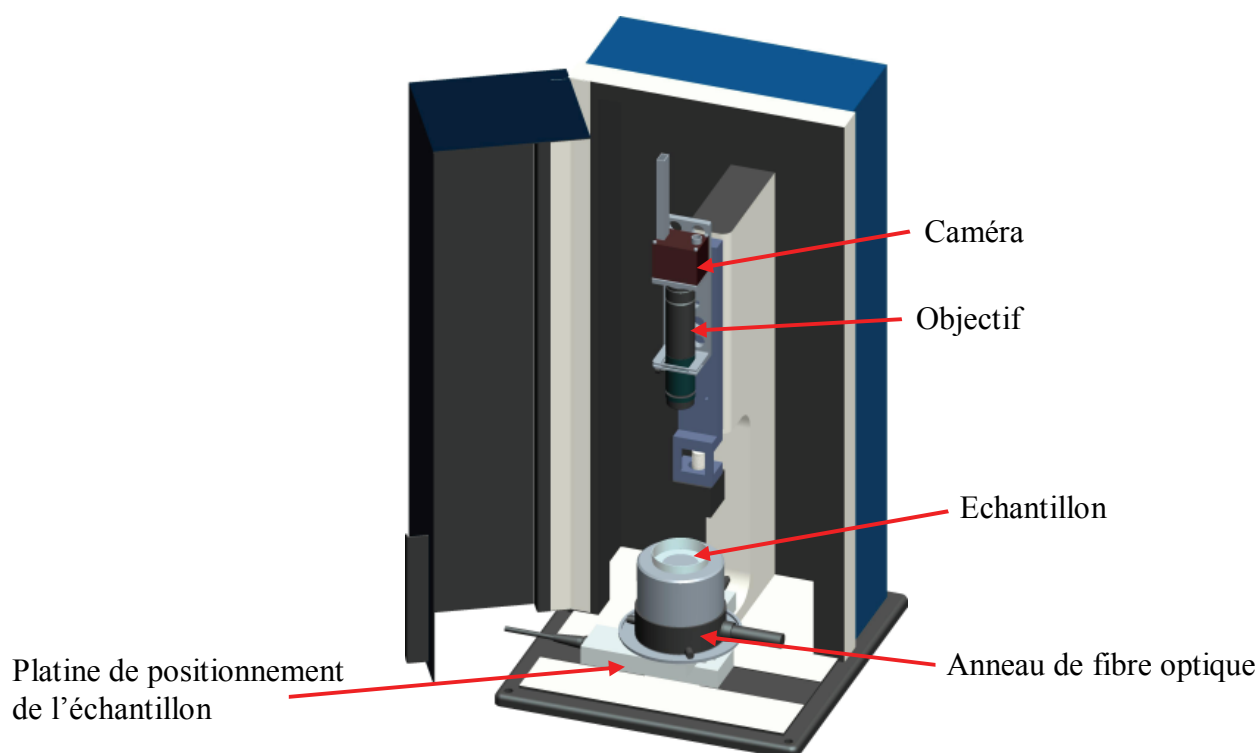


Figure 1 : système d'acquisition d'images BlueBox

² HM 650 V - Microm International GmbH, Walldorf - Allemagne

1.2 Système d'acquisition d'images BlueBox

Un dispositif d'acquisition d'images à l'échelle macroscopique a été construit comprenant une caméra CCD, des objectifs, un système d'éclairage dont l'intensité est contrôlée, des platines motorisées pour positionner la caméra et les échantillons (**figure 1**). Le matériel est décrit plus précisément dans Papineau *et al.*, (2008).

Un anneau de fibres optiques (SCHOTT DCR® IV Light Source) est placé sur un fond noir de manière à rétro-éclairer les coupes avec un angle de 35° environ. La coupe est déposée dans une boîte de pétri placée 5 cm au-dessus du fond noir.

A l'aide d'une caméra PROSILICA EC1600³ on acquiert des images monochromes de 1620 × 1220 pixels dont les niveaux de gris sont codés soit sur 8 bits entre 0 (noir) et 255 (blanc), soit sur 12 bits entre 0 (noir) et 4096 (blanc). La caméra est équipée d'un objectif PRECISE EYE de chez NAVITAR⁴ à focale fixe. Trois grossissements sont possibles en fonction de la lentille choisie : 0,6X, 1,2X et 2,4X. Les champs de vue et la résolution disponibles sont donnés dans le **tableau 1**. Le champ de vue effectif est mesuré avant chaque manipulation grâce à une mire étalon.

Objectif	0,6X	1,2X	2,4X
Taille du pixel	7,33 µm	3,66 µm	1,8 µm
Champ de vue	11,88 × 8,95 mm	5,94 × 4,47 mm	2,97 × 2,24 mm

Tableau 1 : *champ de vue et résolution disponibles*

L'ensemble caméra/objectif est placé sur un rail motorisé. La netteté de l'image est obtenue en déplaçant l'ensemble caméra/objectif, l'objectif étant réglé dans une position fixe.

L'échantillon est déplacé en X et Y sous la caméra grâce à deux platines motorisées MFA-CC⁵ placées perpendiculairement l'une sur l'autre. L'utilisation de platines motorisées permet d'acquérir des images adjacentes sans rotation de l'échantillon qui peuvent être facilement assemblées sous la forme d'images mosaïques.

Le système est piloté par un logiciel développé sous LabView 8.2 (<http://www.ni.com>) conçu pour enregistrer et recharger les réglages correspondant à un type d'acquisition sous la forme de fichiers de protocoles d'acquisition d'images.

1.3 Granulométrie en niveaux de gris

L'analyse granulométrique par morphologie mathématique a été développée à l'Ecole des Mines de Paris (Serra, 1982). Son intérêt pour l'analyse de la taille des cellules de péricarpe de tomate a été montré dans (Devaux *et al.*, 2008).

Le principe de base de la morphologie mathématique est de transformer l'image au travers d'un *masque* de géométrie connue appelé *élément structurant* que l'on déplace de façon à ce que son origine passe par toutes les positions de l'image. La taille et la forme de cet élément sont choisies pour mettre en évidence certaines caractéristiques de l'image. Les éléments

³ Distributeur : Alliance Vision, F-26000 Montélimar

⁴ Distributeur : Alliance Vision, France

⁵ MICRO-CONTROLE SPECTRA-PHYSICS S.A, F- 91000 Évry

structurants usuels sont le carré et la ligne. Le carré est caractérisé par la taille du côté et la ligne par sa longueur et son orientation (**figure 2**).

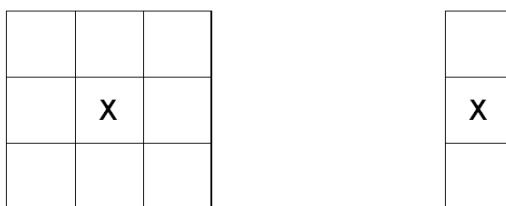


Figure 2 : éléments structurants carré et linéaire vertical de taille 3 pixels

La croix marque le pixel de référence modifié en fonction des valeurs de niveaux de gris de ses voisins. Les voisins pris en compte sont ceux vus au travers de l'élément structurant

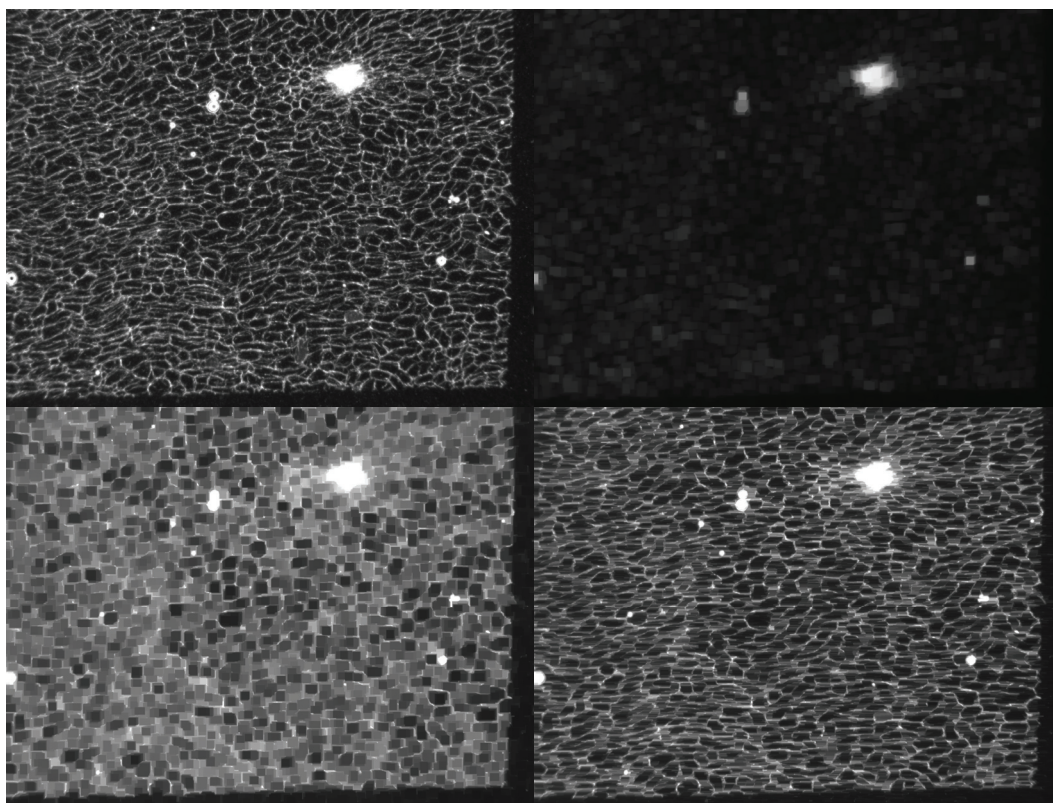


Figure 3 : image de pomme près du cœur

Coupe d'épaisseur 150 μm - Champ de vue : 5,8 x 4,4 mm^2 - résolution : 3,62 μm ;
 Haut : image d'origine : les cellules apparaissent en noir, les parois, les faisceaux vasculaires, les bulles en blanc - ouverture de taille 10 : élément structurant carré ;
 Bas : fermetures de taille 10 - éléments structurants carré et linéaire horizontal ;
 La taille de la fermeture est donnée en nombre de pixel de part et d'autre du pixel de référence : ainsi, la fermeture de taille 10 correspond à un carré de taille 21 pixels.

Les transformations de base sont l'érosion et la dilatation. L'érosion consiste à donner au pixel central la valeur minimum observée dans la fenêtre définie par l'élément structurant et la dilatation la valeur maximum. L'effet est de respectivement diminuer et augmenter la taille des objets clairs. En combinant érosion et dilatation, deux nouvelles transformations sont obtenues : l'ouverture (érosion suivie d'une dilatation de même taille) et la fermeture

(dilatation suivie d'une érosion de même taille). L'ouverture et la fermeture ont pour effet d'éliminer les objets respectivement clairs et foncés plus petits que l'élément structurant tout en préservant la taille des objets plus grands (**figure 3**). Après une ouverture de taille 10, toutes les parois des cellules sont éliminées et le faisceau et les plus grosses bulles sont conservés. Après une fermeture, les cellules dont au moins une dimension est plus petite que la taille du carré sont éliminées ; la taille des cellules les plus grandes est préservée. Ouverture et fermeture peuvent être comparées à un tamisage des objets respectivement clairs et foncés observés dans l'image.

Une distribution de taille s'obtient en appliquant des transformations de taille croissante et en effectuant une mesure après chaque transformation. Dans le cas des images de tissus végétaux, les cellules apparaissent en sombre et la taille des cellules est analysée en utilisant des fermetures de taille croissante. Après une fermeture, la somme des niveaux de gris dans l'image, notée V , augmente. Cette augmentation dépend de la quantité de cellules éliminées. Une courbe granulométrique est calculée comme le pourcentage d'augmentation de la somme des niveaux de gris en fonction de la taille de fermeture :

$$g(i) = \frac{(V(i) - V(i+1))}{(V(\text{initial}) - V(\text{final}))} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

où $V(i)$ est la somme des niveaux de gris après la fermeture de taille i , $V(\text{Initial})$ la somme des niveaux de gris de l'image de départ et $V(\text{final})$ la somme des niveaux de gris après la dernière fermeture.

Les courbes granulométriques sont tracées en fonction de la taille de l'élément structurant exprimée en pixel ou en μm . Des procédures d'analyse granulométrique en niveaux de gris ont été développées sous Matlab (V2007a - www.mathworks.fr) pour s'appliquer à des collections d'images.

1.4 Régions d'intérêt

L'analyse granulométrique ne doit porter que sur la région des cellules, appelée *région d'intérêt* et pas sur le fond sur lequel sont observés les tissus végétaux. Les régions d'intérêt peuvent être déterminées manuellement lorsque le nombre d'images n'est pas trop important. Des procédures automatiques doivent être développées pour les grandes collections d'images.

2. Résultats

Dans cet article, l'intérêt de la méthode est montré pour l'analyse de différents tissus végétaux constitués principalement de cellules de parenchyme pour lesquelles les parois sont blanches et l'intérieur de la cellule noir. Les **figures 3 à 5** montrent des exemples d'images de pomme, de tige de maïs et de tomate, acquises à l'aide du système de macrovision BlueBox. Pour chacune des images, le nombre de cellules observées est important et la structure cellulaire apparaît de manière très claire.

2.1 Choix de l'élément structurant

La **figure 3** illustre le choix de l'élément structurant. Les cellules sont orientées et allongées horizontalement. Les cellules sont presque toutes fermées en utilisant un élément carré alors que très peu d'entre elles sont fermées en utilisant l'élément linéaire horizontal de même taille. En pratique, les éléments structurants carrés permettent d'analyser la plus petite

dimension. En fonction de l'information recherchée et du contrôle de l'orientation des objets dans l'image, on choisira un élément carré ou linéaire.

2.2 Tiges de maïs

La **figure 4** montre une image mosaïque de tige de maïs reconstruite à partir de 9 images de régions adjacentes pour des coupes d'épaisseur 150 μm . La tige est constituée de deux tissus : les faisceaux conducteurs de sève apparaissant comme des taches blanches de grande taille et les cellules de parenchymes situées entre les faisceaux.

La granulométrie par fermeture en niveaux de gris a été appliquée pour déterminer la taille des cellules de parenchymes. Les cellules étant de forme isotrope, des éléments structurants carrés ont été utilisés. La taille maximum d'analyse a été fixée à 250 μm en explorant les diamètres de cellules à l'aide d'outils interactifs sous ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij). Elle correspond à une fermeture de taille 35.

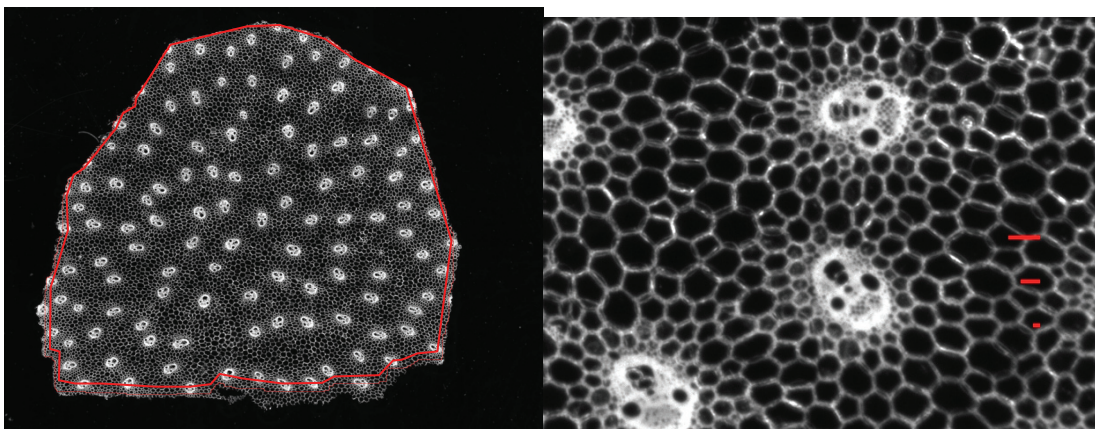


Figure 4 : image mosaïque de tige de maïs (champs de vue : 15,9 mm x 12,4 mm - Résolution 3,62 μm)
Zoom sur une région de 2,3 x 1,7 mm avec des lignes de longueur 25, 75 et 125 μm .

L'analyse granulométrique a été appliquée sur la région d'intérêt dont le contour est tracé sur la **figure 4**. La courbe granulométrique est tracée en fonction de la taille du côté des carrés exprimée en μm (**figure 5**). Les variations de niveaux de gris ont été observées principalement pour des tailles variant entre 25 et 125 μm avec un maximum à 75 μm . Les lignes de dimension 25, 75 et 125 μm tracées dans l'image de la **figure 4** montrent la cohérence des valeurs trouvées et des tailles observées pour les cellules.

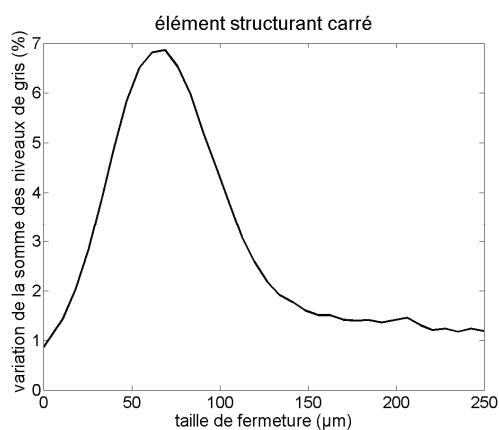


Figure 5 : Tige de maïs. Courbe granulométrique par fermeture à l'aide d'éléments structurants carrés

2.3 Péricarpe de tomate

La **figure 6** montre deux exemples d'images de péricarpe de tomate obtenues à partir de coupes d'épaisseur de 250 μm . L'épiderme est situé en haut de l'image et on observe des faisceaux vasculaires au centre du péricarpe. Les cellules sont de taille et de forme variable en fonction de la position : petites et rondes près de l'épiderme et plus allongées dans la deuxième moitié du péricarpe.

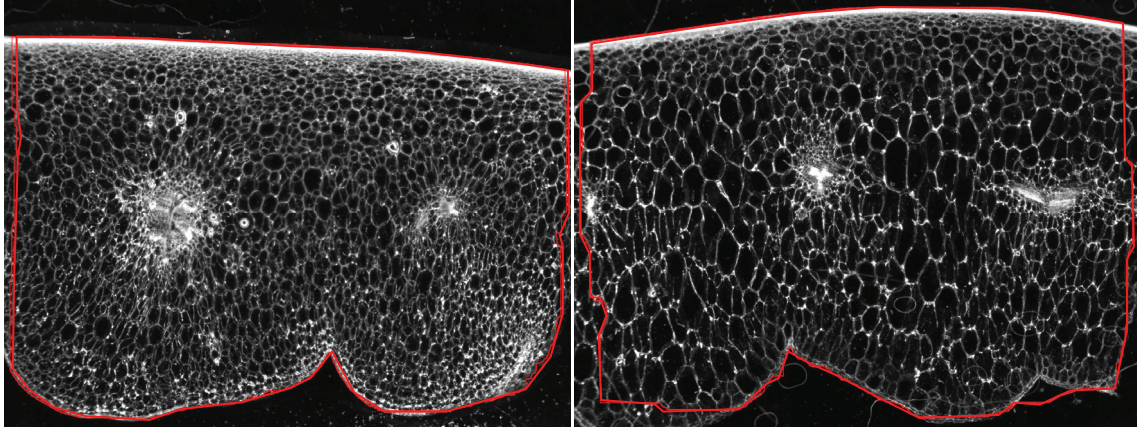


Figure 6 : exemples d'images de péricarpe de tomate et leur région d'intérêt.

L'allongement des cellules perpendiculairement à l'épiderme a été mis en évidence en utilisant des éléments structurant linéaires verticaux et horizontaux (**figure 7**). La taille maximum de fermeture a été fixée à 75, correspondant à une longueur de 1060 μm , de manière à analyser les cellules de tomate les plus longues.

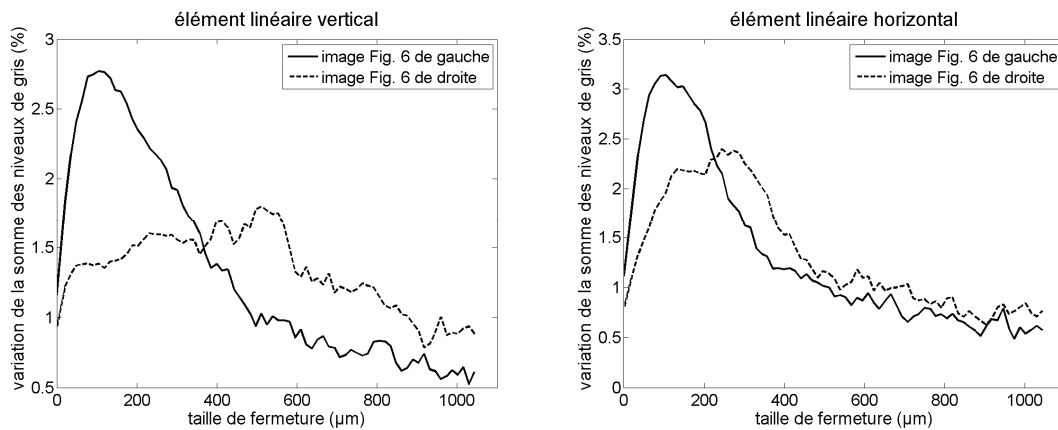


Figure 7 : Courbes granulométriques extraites pour les images de tomate de la figure 6. Gauche : élément linéaire vertical. Droite : élément linéaire horizontal.

Les différences de longueur de cellules perpendiculairement à l'épiderme sont mises en évidence en utilisant un élément linéaire vertical. Dans le cas de la première image, on observe les variations de niveaux de gris majoritairement pour des tailles inférieures à 400 μm alors que dans la deuxième image, on observe des variations jusqu'à 900 μm .

Cette analyse est rendue possible en contrôlant le positionnement de l'épiderme dans l'image lors de l'acquisition et en quantifiant l'allongement des cellules par analyse granulométrique.

Conclusion et perspectives

L'analyse granulométrique en niveaux de gris d'images de tissus végétaux acquises à l'échelle macroscopique permet d'extraire des informations sur la taille des cellules. L'analyse est dite globale par opposition aux approches quantifiant la taille et la forme de chaque cellule individualisée.

La fermeture étant comparable à un tamisage, les courbes granulométriques s'interprètent comme des distributions de taille. La mesure est basée sur des variations de niveaux de gris et dépend à la fois de la taille des cellules et du contraste entre parois et cellules. En ce sens, la méthode est classée parmi les méthodes d'analyse de texture d'images. Elle ne garantit pas *a priori* une relation de proportionnalité directe entre la variation de niveaux de gris et la quantité réelle de cellules d'une taille donnée. La mesure est proche d'une distribution de surface dans le cas où le contraste entre cellule et paroi est homogène dans les images.

L'intérêt majeur de la méthode est de pouvoir analyser et comparer des collections d'images de tissus végétaux sur la base de la taille des cellules. L'échelle macroscopique présente l'avantage d'observer des régions représentatives des tissus de manière rapide. L'analyse statistique peut être réalisée par analyse multidimensionnelle des courbes granulométriques (Chaïb *et al.*, 2007). Des calculs de *taille moyenne en niveaux de gris* à partir des courbes sont également envisageables.

Bibliographie

- Bharati M.H., Jay Liu J., MacGregor J.F. (2004) Image texture analysis: methods and comparisons. *Chemometr Intell Lab* 72: 57–71
- Chaïb J., Devaux M.-F., Grotte M.G., Robini K., Causse M., Lahaye M., Marty I. (2007) Genetic and physiologic relationship among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruit. *J Exp Bot* 58: 1915-1925
- Cheniclet C., Rong W.Y., Causse M., Frangne N., Bolling L., Carde J.-P., Renaudin J.-P. (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol* 139: 1984-1994
- 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: 199-209
- Harada T., Kurahashi W., Yanai M., Wakasa Y., Satoh T. (2005) Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species, *Sci Hort* Amsterdam 105: 447-456
- Haralick R.M. (1979) Statistical and structural approaches to texture, *Proceedings IEEE* 67: 786-804
- Papineau P., Sire A., Devaux M.-F., Bansard S. (2008) Système de prise d'image macroscopique. Journées de la mesure et de la métrologie, Biarritz, 6-9 octobre 2008
- Serra J. (1982) *Image Analysis and Mathematical Morphology*, London: Academic Press.
- Soille P. (2003) *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Berlin: Springer-Verlag