

# TP1 - Automatisation Données Biologiques

## L2S4

### Prise en main du Logiciel

#### Exercice 1

1. Ouvrir l'image *Tree rings (File/Open Samples)*. Quels sont les dimensions de l'image, le nombre de pixels total et sa taille en mémoire? Quelle LUT est utilisée ? Vérifier avec *Image/Show Info*
2. Sur combien de bits sont échantillonnés les niveaux de gris? Comment calculer le « poids informatique » attendue du fichier?
3. Quelle est la valeur du pixel de coordonnées (0,0)? Même question pour les pixel (89, 93) et (767,128). N'hésitez pas à zoomer (petite loupe dans la barre d'outil)
4. Quelle est la valeur du pixel de coordonnées (135,55)? Inverser la LUT (*image/Lookup Tables*), est ce que le pixel (135,55) a changé de valeur ? Tester les autres LUT. Est ce que l'information dans l'image est modifiée lors du changement de LUT ?
5. Revenez à une LUT en niveau de gris et afficher l'histogramme de l'image (*Analyze/Histogram*). Modifier le contraste et luminosité (B&C) sans appuyer sur Apply (*Image/Adjust/Brightness Contrast*). Que se passe t il au niveau de l'apparence de l'image ? Est ce que les valeurs de pixel changent ?
6. Enregistrer l'image sur le bureau fermez là et rouvrez là. Est ce que vos changements de B&C ont été pris en compte ? Pourquoi ?
7. Appuyer maintenant sur Auto dans B&C, appuyer sur Apply et afficher le nouvel histogramme. Que s'est il passé ? Est ce que l'information dans l'image est modifiée ? Enregistrer l'image sur le bureau fermez là et rouvrez là. Est ce que vos changements de B&C ont été pris en compte ?
8. Nous allons ajouter artificiellement du bruit dans l'image. Dupliquer l'image (*Image/Duplicate*). Ajouter un premier type de bruit sur l'image dupliquée (*Process / noise / Add specified noise => valeur 50*). **Avant de tester les différents filtres numériques d'ImageJ (Process/Filter), dupliquez l'image bruitée avant chaque application d'un filtre.**
9. Reprendre l'image d'origine non bruitée et appliquez cette fois-ci le bruit salt&Pepper et re-testez les filtres sur une copie d'image bruitée.

## A partir de maintenant, les images sont à récupérer sur le site [silico.biotoul.fr](http://silico.biotoul.fr)

### Exercice 2

L'image *FluorecentCells.jpg* correspond à des cellules endothéliales d'artère pulmonaires bovines. Le marquage fluorecent est le suivant : bleu (noyau), vert (tubuline), rouge (F-Actin).

1. Quel est le codage de l'image ?
2. Image/Color/Split\_channels => Que s'est il passé ?
2. Reformuler l'image initiale avec Image/Color/merge\_channels (cocher *keep source*)
3. Reformuler une image avec le DAPI en Magenta, F-Actin en jaune et Tubulin en bleu.

## **Premier pas dans la segmentation par seuillage**

### Exercice 3

1. Ouvrir l'image A4dapi
2. Sachant que 10 microns est égal à 90 pixels, calibrez votre image en changeant la taille du pixel et l'unité de mesure (micron) dans *Analyze/Set Scale*. Qu'observez-vous sur les indications de taille de l'image?
3. Dupliquez l'image avant de commencer la segmentation par seuillage de l'image
4. Réalisez un seuillage sur l'image dupliquée de manière à segmenter les noyaux (*Image/Adjust/Threshold*). Après exécution de la commande "Apply", vous obtenez une **image binarisée**. Les noyaux sont-ils correctement segmentés?
5. Avant de lancer une analyse d'objet de votre image binarisée, il est important d'indiquer au logiciel les mesures à réaliser parmi plusieurs choix. Pour cela, choisissez les paramètres à mesurer dans *Analyze/Set Measurements* tels que : l'aire, le périmètre et l'intensité moyenne.
6. Réalisez les mesures sur l'image binarisée (*Analyze/Analyze Particles*). Cochez les options "Add to Manager" et "Exclude on Edges". Les mesures géométriques sont-elles satisfaisantes? Et les mesures de fluorescence?
7. Dans la fenêtre ROI Manager, cliquez sur *show all* afin d'appliquer les masques créés sur l'image d'origine puis cliquer sur Measure. Qu'observez-vous?

## **Notion de MACRO**

### Exercice 4

Nous allons créer une macro qui permet d'enchaîner les opérations suivantes : Ouverture de l'image A4Dapi => Segmentation par seuillage de l'image => mesure des surface des noyaux => sauvegarde des résultats.

1. Allez dans Plugins/Macros/Record

2. Ouvrir l'image A4 DAPI.tif. Observez la ligne de code dans la fenetre "Macro record"
3. Allez dans Image/Adjust/Threshold et adapter le seuillage
4. Analyze/Set Measurements => choisir l'aire
5. *Analyze/Set Scale*
6. Analyze>Analyze particles
7. Sauvegarder sur le bureau la fenetre Results
8. Enregistrez votre macro via la fenetre « Macro record »: Create puis File> Save as> EssaiMacro
9. Tester votre macro après avoir ferme tous vos fichiers : Plugins>Macros>Runs> EssaiMacro

### **Exercice 5**

Nous allons créer une macro pour traiter plusieurs images semblables. Vous avez des images de noyau (DAPI) de cellule Hela après 12h et 24h de culture (images wt\_12\_DAPI.jpg et wt\_24\_DAPI.jpg).

1. Traiter une image manuellement en enregistrant une macro pour traiter les autres images de DAPI prises dans les mêmes conditions.
2. En utilisant la macro que vous avez créé, déterminer et **réaliser un tableau** avec :
  - a. nombre moyen + écart type de noyau par  $\text{mm}^2$  entre les deux conditions (voir sur internet la conversion  $\text{micron}^2$  vers  $\text{mm}^2$ )
  - b. Surface et périmètre moyens+ écart type pour 12h et 24h de culture
  - c. Intensité fluorescence moyenne + écart type pour 12h et 24h de culture

### **Exercice 6**

Vous voulez connaître l'évolution au cours du temps de la surface racinaire moyenne + écart type de *Medicago* après 6, 7, 9 et 10 jours de culture. (images J6-1.tif à j10-5.tif). Vous allez donc tracer une courbe de l'aire moyenne en  $\text{cm}^2$  d'une racine de *Medicago* en fonction du temps. Pour cela vous réaliserez un traitement d'images (5 par temps de culture) en utilisant ou pas les Macros et sachant que 500 pixels = 4,5 cm.

## **Le défi**

Dans une unité de recherche, on s'intéresse au comportement de racines de légumineuse *Medicago truncatula* suite à une attaque tellurique par un champignon (Image : *Medicago*-Champignon). Dans ce cas les expériences sont menées en culture in vitro dans des boites carrées de 12 cm.

L'objectif de l'expérience est d'identifier des lignées de *Medicago truncatula* (collection de plusieurs milliers de lignées) qui sont résistantes à l'infection par le champignon. Lorsque le champignon s'installe et que la maladie se développe, les racines présentent une coloration brune depuis l'apex de la racine vers le collet de la plante. Plus la plante est sensible plus le brunissement s'étendra dans la racine. L'image vous présente 2 boîtes contenant chacune 5 plantes. La boîte de gauche sert de témoin car les plantes ne sont pas inoculées par le champignon (les racines sont blanches), la boîte de droite vous présente 5 plantes de la même lignée avec des symptômes de brunissement plus ou moins importants.

Avec Image J, trouver un enchaînement de tâches qui permettrait de quantifier la coloration des racines infectées par rapport au témoin.