

Thème 02 - Les outils de base 1

La fenêtre ImageJ se compose de trois parties. Une barre de menus, une barre d'outils et une barre d'état. Vous allez maintenant apprendre à connaître les outils de base d'ImageJ plus en détail.

Exercice 2.1: informations Pixel, zoom et le défilement

Ouvrez l'image *A4 dapi 1.tif* à partir du dossier *01 – opening images*.

- Notez que certaines informations sur l'image sont affichées en haut de la fenêtre image. La taille de l'image en pixel, le type et la taille de l'image dans la mémoire de l'ordinateur.
- Sélectionnez l'outil loupe sur la barre d'outils et cliquez sur l'image. Un clic gauche fait un zoom-in, un clic droit sur un zoom-out. Vous pouvez utiliser les touches "+" et "-" du clavier pour faire un zoom.
- Notez l'indicateur de position dans le coin supérieur gauche, lorsque l'image est plus grande que la fenêtre.
- Zoom-in afin que l'indicateur de position apparaisse. Sélectionnez l'outil de défilement (la main) sur la barre d'outils. Cliquez sur l'image et sans relâcher le bouton Déplacer la souris. Allez dans le coin inférieur droit de l'image.
- Sélectionnez l'outil loupe de nouveau. Zoom-in afin que l'indicateur de position apparaisse. Vous pouvez faire glisser l'image en appuyant sur la barre d'espace au lieu d'utiliser l'outil défilement. L'avantage est que d'un autre outil peut être actif en même temps. Essayez de faire défiler vers le coin inférieur gauche.
- Zoom in au maximum et déplacez la souris sur l'image. Regardez la barre d'état de la fenêtre ImageJ. La position du pixel situé sous le pointeur de la souris et sa valeur en niveaux de gris sont affichées.

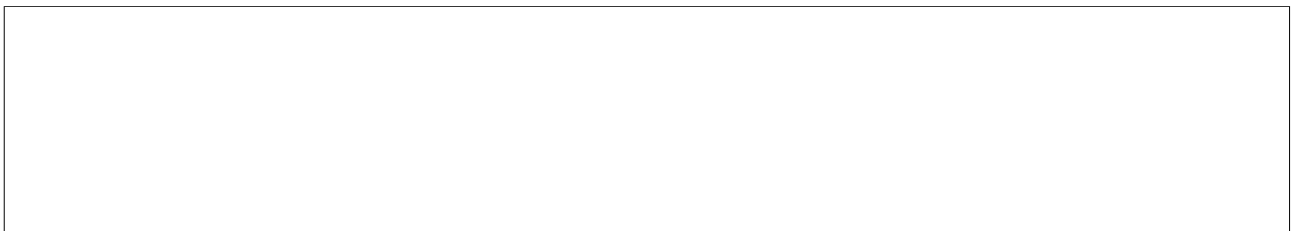
a) Quel est le maximum possible de zoom?	
Quel est le minimum de zoom?	
b) Quel est la valeur en niveaux de gris du pixel de coordonnées x = 549 et y = 305?	
et du pixel de coordonnées x = 58 et y = 246?	
c) Quelle est la largeur et la hauteur de l'image?	
Quel est son type?	
Quelle est sa taille dans la mémoire?	
d) Déplacez la souris sur l'image. Dans quelle direction les coordonnées x augmentent ?	
Dans quelle direction les coordonnées y augmentent?	
A quoi ressemble le système de coordonnées?	

e) Vous pouvez changer l'orientation de l'axe des y. Ouvrir la boîte de dialogue **Analyse> Set Measurements ...** et sélectionnez *Invert Y coordinates*. Déplacez la souris sur l'image à nouveau. Comment le système de coordonnées a changer? Désélectionnez *Invert Y coordinates*.

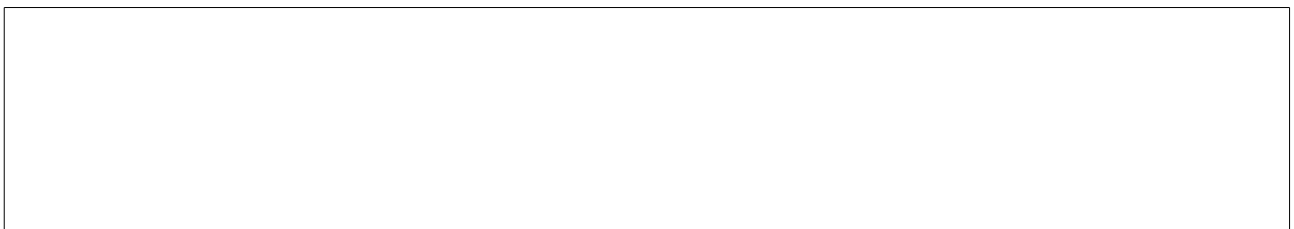
Exercice 2.2: outils de sélection Zone

Assurez-vous que l'outil de sélection rectangulaire est actif. Vous pouvez maintenant faire une sélection rectangulaire dans l'image en cliquant sur un point et en faisant glisser la souris. Tout en faisant cela la largeur, la hauteur et le ratio de la sélection sont affichés. Lorsque vous relâchez le bouton de la souris que vous avez fait une sélection sur l'image. Vous pouvez toujours modifier sa position en cliquant à l'intérieur de la sélection et en la faisant glisser. En utilisant les poignées vous pouvez modifier la taille de la sélection.

- a) Faire une sélection rectangulaire sur l'image, déplacer la, modifier sa taille. Trouver dans la documentation ImageJ (ImageJ User Guide) quelles sont les touches de modification pour l'outil de sélection rectangulaire et ce qu'elles font. Essayez-les.
- b) Notez que vous pouvez réaliser des sélections complexes en utilisant les touches Maj ou Alt. Maj ajoute à une sélection. Alt supprime d'une sélection. Essayez-les. Déplacer la sélection complexes . Notez que vous créez une seule sélection, même si les parties peuvent être séparés.
- c) Modifier la couleur de sélection en magenta (**Edit>Options>Colors...**).
- d) Clic-droit sur l'outil de sélection rectangulaire, et sélectionnez l'outil rectangle arrondi. Faites une sélection. Notez que, contrairement à l'outil rectangle, cet outil utilise la couleur de premier plan. Vous pouvez la modifier en double-cliquant sur l'outil **Color-picker**. Il utilise aussi la largeur de ligne courante. Changez-la dans **Edit>Option>Line Width**
- e) Double-cliquez sur l'outil rectangle arrondi. Une boîte de dialogue s'ouvre. Modifiez la valeur de l'option « *Corner diameter* » et tracer une nouvelle sélection.
- f) Essayez les autres outils de sélection d'aire jusqu'à l'outil à main levée. Notez que lorsque vous utilisez l'outil de sélection à main levée, vous ne devez pas essayer de fermer vous-même. Il suffit d'aller à proximité de début et relâchez le bouton de la souris. La sélection sera automatiquement fermée.
- g) Faites une sélection et exécutez la commande **Image>Crop**. Qu'est-ce qu'il se passe?



Vous pouvez recharger l'image originale du disque en utilisant **File>Revert (ctrl+r)**. Faites une nouvelle sélection et exécutez la commande **Image>Duplicate (shift+d)**. Qu'est-ce qu'il se passe?



Exercice 2.3: Mesure et le tableau des résultats

La commande **Analyze>Measure (m)** mesure les propriétés de l'image entière ou de la sélection s'il en existe une. Avec la boîte de dialogue **Analyze>Set Measurements** vous pouvez choisir les propriétés qui seront mesurées. Les mesures sont inscrites dans le tableau global des résultats.

- a) Utiliser l'outil *freehand-selection* pour sélectionner un noyau, puis mesurer sa surface et sa valeur moyenne en niveaux de gris. Faites la même chose pour plusieurs noyaux. Zoomer sur l'image pour faire une sélection précise. {polygone selections, edit-selection-fit spline}
- b) Dupliquer la fenêtre Results **File>Duplicate**. Revenir à l'image pour faire une nouvelle mesure. Dans quelle fenêtre de résultat est-elle ajoutée?

- c) Utilisez la commande **File>Rename** pour renommez la table de résultats d'origine (Results) en «Results old». Faire une nouvelle mesure. Dans quel tableau des résultats est-elle ajoutée?

- d) Effacer le tableau des résultats en utilisant **Results>Clear Results** et mesurer au moins 3 noyaux de nouveau. Quelle est la moyenne, l'écart-type, le min, le max et la distribution des surfaces? Utiliser **Results>Summarize** et **Results>Distribution...** pour obtenir les réponses.

Exercice 2.4: outils de sélection de ligne

Essayez les outils de sélection ligne *straight*, *segmented*, *freehands*.

Notez que lors de la création d'une ligne droite ou d'une ligne segmentée, la longueur du segment en cours et l'angle avec l'axe des x sont affichés dans la barre d'état.

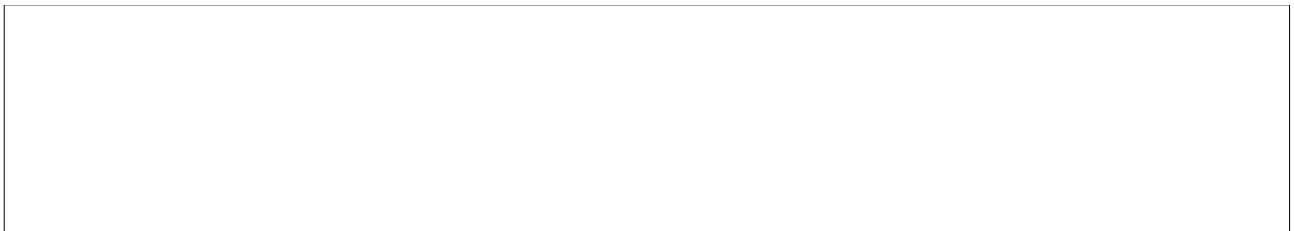
- a) Utilisez l'outil *straight-line* pour mesurer les distances entre les centres des noyaux.
- b) Utilisez l'outil *straight-line* pour mesurer le diamètre des noyaux.
- c) Utilisez l'outil *segmented-line* pour mesurer les périmètres des noyaux.
- d) Utilisez l'outil *freehand-line* pour mesurer les périmètres des noyaux.
- e) Utilisez l'outil *angle tool* pour mesurer l'angle entre trois noyaux.

Exercice 2.5: Profil d'intensité

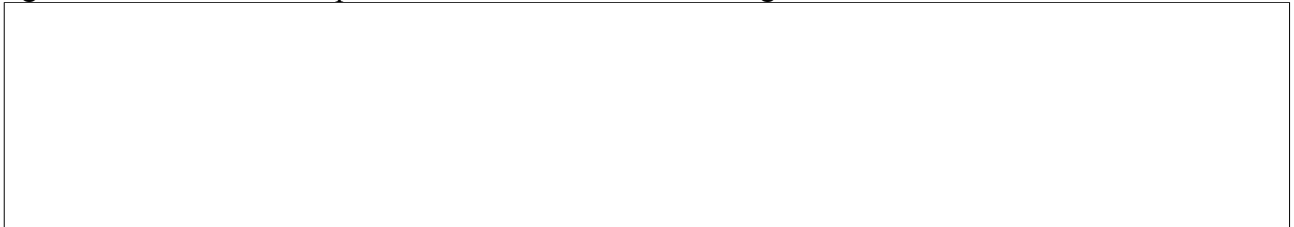
Vous pouvez utiliser les outils de sélection de ligne pour créer un profil d'intensité « *plot profile* » : c'est la courbe des valeurs d'intensité le long de la ligne.

Faire d'abord une sélection de ligne à travers un noyau, puis appuyez sur la touche k (le raccourci pour **Analyze->Plot profile**). Notez que, lorsque la largeur de la ligne est >1 , le profil sera la moyenne sur la largeur de la ligne. Vous pouvez modifier la largeur de ligne en double-cliquant sur le bouton de l'outil ligne.

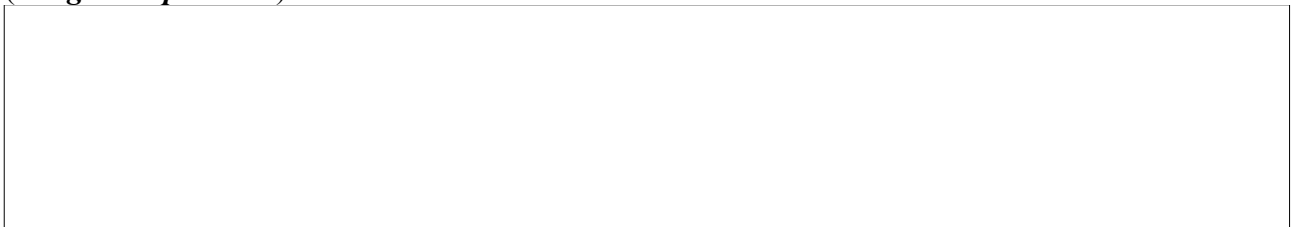
a) Utiliser un profil d'intensité pour estimer le diamètre d'un noyau. Notez que le profil d'intensité est aussi une image sur laquelle vous pouvez utiliser les outils d'ImageJ. Y a-t-il un avantage à utiliser un profil d'intensité plutôt que de mesurer le diamètre de l'image originale?



b) Créer un profil d'intensité dans un noyau. Sans changer la sélection, modifiez la largeur de la ligne et créer un nouveau profil d'intensité. Y a-t-il des changements?



c) Créer un profil d'intensité à travers un noyau, agrandir la ligne et créer un autre profil d'intensité (La meilleure façon de le faire sans changer la direction est d'utiliser une ligne horizontale ou verticale avec shift enfoncée.). Quelle est la différence entre les profils d'intensité? Mesurer les distances entre les deux mêmes points intéressants dans les deux profils d'intensité. Pensez-vous obtenir le même résultat dans les deux profils d'intensité? Comment est-ce possible? - Indice: Regardez la largeur en pixels et la hauteur dans les propriétés des deux images (**Image>Properties...**).



d) Créer un profil d'intensité dans un noyau. Cliquez sur le bouton List dans la fenêtre du profil. Copier les valeurs dans le presse-papiers (Ctrl + A pour les sélectionner toutes et ctrl + C pour copier). Ouvrez **Analyze>Tools>Curve Fitting...** Supprimer les valeurs initiales et coller les valeurs du profil (Ctrl + v). Utiliser une gaussienne pour tracer la courbe des points de mesure.

Exercice 2.6: sélections Point

Vous pouvez utiliser les outils de sélection « point » pour compter manuellement des objets dans une image. Vous pouvez utiliser l'outil Point et ajouter des points avec la touche shift enfoncée ou l'outil Multipoint. Vous pouvez supprimer des points en utilisant la touche alt.

Régler les options de l'outil point (double clic dessus le bouton) en ne cochant que *Label Point*

a) Faire une sélection de 3 points sur trois noyaux, puis faire un point quelque part dans l'arrière-plan et ajouter des points sur les noyaux restants. Supprimer le point sur le fond en utilisant alt-clic. Qu'advient-il de la numérotation des points?

b) Enregistrer une image avec une sélection de point quelque part au format TIF (**File>Save As>Tiff...**). Fermer l'image et de recharger l'image enregistrée (**File>Open...**). Qu'est-il arrivé à la sélection? Peut-on encore le modifier?

c) Vérifier l'option *Auto-Mesure* de l'outil Point. Que fait-il? Astuce: Regardez le tableau des résultats.

d) Utiliser l'outil de sélection de point avec les options *Auto-Mesure* et *Auto-Next Slice* pour pointer la particule jaune dans l'image *moving-particles.tif* du dossier 02 - *basic tools*

Exercice 2.7: seuillage et baguette magique

La baguette magique permet de faire une sélection de pixels connexes dans une image. Il y a deux façons de déterminer quels sont ces pixels. Soit l'outil sélectionne tous les pixels avec la même valeur intensité (éventuellement plus ou moins une tolérance donnée) ou elle sélectionne tous les pixels ayant une intensité plus grande qu'un minimum donné. Le seuil peut être réglé en utilisant la fenêtre de seuillage **Image>Adjust>Threshold** (shift+t).

Changer l'option d'affichage de *Red* à *Over/Under*

Chaque clic avec l'outil baguette sur une zone seuillée crée une sélection. Si vous voulez supprimer

la sélection ctrl + shift + a.

Ouvrez l'image *A4 dapi 1.tif* à partir du dossier *01 – opening images*.

a) Utiliser l'outil baguette en combinaison avec le réglage de seuil pour sélectionner les noyaux. Mesurer les noyaux.

Quels sont les valeurs du plus petit et du plus grand périmètre?		
Quels sont les valeurs du plus petit et du plus grand diamètre?		

b) Utilisez l'outil baguette pour sélectionner tous les noyaux dans une seule sélection (shift-clic). Pour savoir quel pourcentage de l'image est couvert par les noyaux. Astuce: Vous pouvez utiliser la commande **Edit>Selection>Make Inverse** pour inverser une sélection.

Exercice 2.8: Le roi-manager

Le roi-manager est un outil qui permet de travailler avec les sélections. Vous pouvez conserver un nombre illimité de sélections, afficher, les modifier et de les mesurer quand vous le voulez. Dans la fenêtre du ROI-manager les commandes agissent sur la ROI sélectionnée ou sur toutes les ROI si aucune n'est sélectionnée.

Sur l'image *A4 dapi 1.tif*

a) Utiliser l'outil baguette pour sélectionner un noyau, puis appuyer sur la touche 't' (raccourci pour ajouter au roi-manager **Analyze>Tools>ROI Manager...**). Sélectionnez l'option *Show All* sur le roi-manager. Sélectionnez les autres noyaux ajouter les au roi-manager.

b) Cliquez dans l'image sur un label (par exemple 5). Notez que la ligne correspondante dans le roi-manager est sélectionnée. Modifier la sélection (enlever une partie en utilisant l'outil *Freehand lines* avec alt enfoncée). Appuyez sur le bouton *Update* du roi-manager pour rendre le changement permanent.

c) Sélectionnez une ou plusieurs lignes dans le roi-manager (vous pouvez utiliser Ctrl / shift) et appuyez sur le bouton *Measure*. Appuyez sur le bouton *Deselect*, fermer la fenêtre les résultats et appuyez à nouveau sur *Measure*.

d) Qu'est-ce que fait *Flatten*? Astuce :Regarder sur le type d'image résultante.

--

e) Définir le seuil inférieur de sorte que l'arrière-plan soit bleu et qu'il n'y ai pas de trous dans les noyaux. Vous pouvez créer une sélection à partir des valeurs de seuillage en utilisant **Edit>Selection>Create Selection**. Ajouter la sélection dans le roi-manager .Exécutez la commande *Split* du roi-manager. Qu'est-ce qu'il se passe?

f) Ajouter les sélections de tout les noyaux dans le roi-manager. Maintenant, ouvrez l'image *A4 Rhod 1.tif* à partir du dossier *02 - basic tools*. Avec l'image nouvellement chargée, désactivez l'option *Show All* dans le roi-manager et le sélectionner la à nouveau. Appuyez sur *Measure*. Qu'est-ce qu'il se passe?

Exercice 2.9: Mesure d'objets avec l'analyseur de particules

Jusqu'à présent, toutes les sélections ont été créées individuellement. Le particule-analyseur permet de créer automatiquement une sélection pour chaque objet (particules) : une région de pixels ayant une valeur comprise entre le seuil minimum et le seuil maximum.

Sur l'image *A4 dapi 1.tif*

a) Utiliser le seuillage (***Image>Adjust>Threshold*** ou shift+t) et le particule-analyseur (***Analyse>Analyse Particles...***) afin d'ajouter les noyaux au roi-manager (tout dé-sélectionner dans la boîte de dialogue du particule-analyseur sauf *Add to Manager*).

b) Supprimer tout dans le roi-manager et utiliser de nouveau le particule-analyseur. Cette fois, sélectionnez l'option *Exclude on edges*. Pouvez-vous expliquer ce que fait cette option et quand elle doit être utilisée?

c) Utiliser le particule-analyseur de nouveau. Cette fois, essayez d'exclure les objets qui sont trop petits pour être des noyaux en fixant une taille minimale dans la boîte de dialogue.

d) Utiliser le particule-analyseur pour sélectionner seulement les noyaux qui ont une valeur faible de circularité. Quel est la valeur qui exclut les deux noyaux ayant la valeur de circularité la plus faible?

e) Ouvrez l'image *inclusion.tif*. Imaginez que les rectangles blancs sont des objets. Utilisez le particule-analyseur avec et sans l'option *Include holes*. Quelle est la différence?

f) Utiliser le particule-analyseur pour savoir combien de taches lumineuses il y a dans l'image *blobs.gif* dans le dossier *02 - basic tools*. Quelle est la superficie moyenne des taches?

Exercice 2.10: Les flèches, des annotations et des superpositions

Les images peuvent être annotées de manière non destructive, en utilisant des superpositions « *overlays* ». Les flèches et d'autres sélections peuvent être ajoutées à l'*overlay* en appuyant sur la touche 'b' (***Image>Overlay>Add Selection***).

Sur l'image *A4 dapi 1.tif*

- a) Utiliser l'outil flèche (clic-droit sur le bouton *line*) pour créer les flèches qui pointent vers les noyaux. Avant de créer les flèches, utilisez les options de l'outil flèche pour définir la couleur magenta.
- b) Utilisez l'outil de texte pour écrire une annotation pour chaque flèche (noyau1, noyau2) . Appuyez sur ctrl + alt + b pour ajouter du texte à l'*overlay*
- c) Modifier les flèches. Astuce: Utilisez ***Image>Overlay>To ROI Manager***. N'oubliez pas de cliquer sur le bouton *Update* du roi-manager après la modification d'une flèche.
- d) Remplacer le texte du noyau1 par un autre texte (« le premier noyau »). Astuce: - Vous ne pouvez pas modifier le texte lui-même. Sélectionnez le texte dans le roi-manager, écrire un nouveau texte avec l'outil texte et appuyez sur le bouton *Update*.
- e) Ajouter une troisième annotation. Astuce: Convertir la sélection de nouveau en overlay, ajouter la nouvelle annotation à l'*overlay*.
- f) Utiliser *Flatten* pour créer une image contenant les annotations que vous pouvez copier dans votre présentation. Dans cette image les annotations ne sont pas superposées à l'image, les valeurs des pixels ont été changées.