



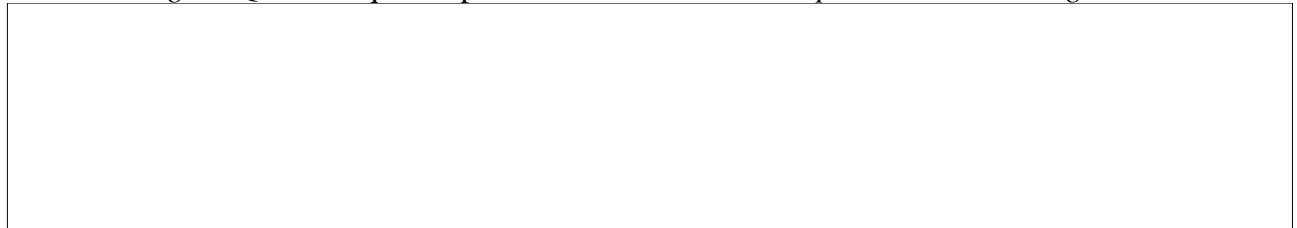
Thème 04 - Qu'est-ce qu'une image numérique?

Exercice 4.1 - Comment est représentée l'image par l'ordinateur Pixels

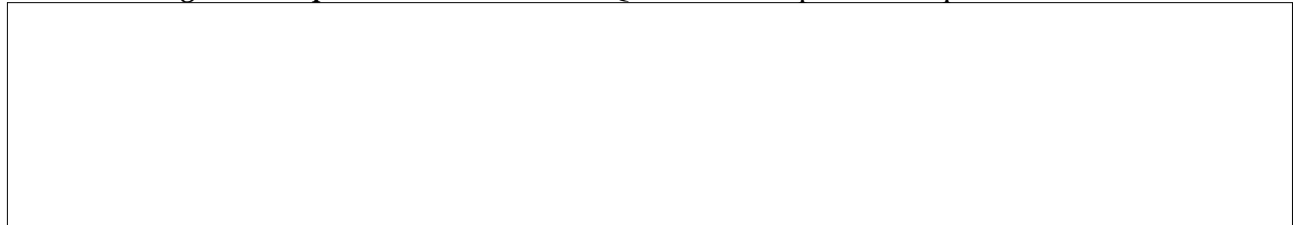
Les images peuvent avoir 2 ou 3 dimensions spatiales, une dimension temporelle et un certain nombre de canaux de couleur. Une image est un tableau de points d'échantillonnage (pixels).

a) Ouvrez *example1.tif* dans le dossier *04 - what is a digital image*. Sélectionnez l'image entière (ctrl + a) et exécutez **Plugins>Tools>Display Pixel Values**

b) Zoomer dans l'image. Vous devriez maintenant voir des petits carrés homogènes. Notez que ce n'est qu'un moyen possible d'afficher les pixels. Comme dit ci-dessus nous devrions plutôt penser à des points d'échantillonnage. Allez dans **Edit>Options>Appearance** et sélectionnez *Interpolate Zoomed Images..* Qu'est-ce qu'il se passe? Désélectionnez *Interpolate Zoomed Images..*



c) Les valeurs des pixels clairs sont plus fortes que celles des pixels foncés ?
Exécuter **Image>Lookup Tables>Invert LUT**. Quelle est la réponse à la question maintenant?



d) Enregistrer l'image sous forme de texte (**File>Save As>Text Image**). Ouvrez-le avec un éditeur de texte, changer certaines valeurs à 255 et enregistrer le fichier modifié. Réimportation le texte-image dans ImageJ (**Import>Text Image**).

Exercice 4.2 - Comment est représentée l'image par l'ordinateur- Formats de l'image en mémoire

ImageJ a différentes façons de représenter des images, chacune avec des capacités différentes.

8-bit - valeurs de niveaux de gris- entier non signé entre 0 et 255 (2^8-1)

16-bit - valeurs de niveaux de gris- entier non signé entre 0 et 65535 ($2^{16}-1$)

32-bit - valeurs de niveaux de gris- signé à virgule flottante $\pm 3,4 \times 10^{38}$; 6-7 décimales de précision et des valeurs spéciales comme NaN pour «pas un nombre», Infini et -Infini

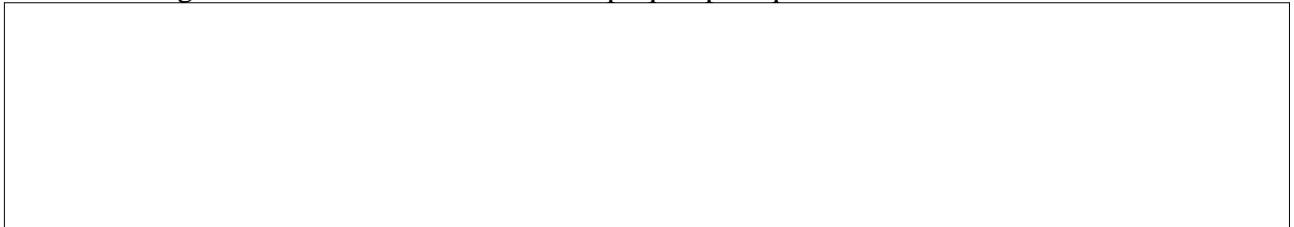
8-bit couleur- pas vraiment un type, utile pour convertir une image RVB en 8-bit par une cartographie couleur de la valeurs de niveaux de gris (lookup table ou LUT)

Couleur RVB - image couleur 24 bits, composé de trois images 8-bit, une pour chaque composante rouge, verte et bleue.

Hyperstacks - permettent d'afficher des superpositions d'un nombre illimité de canaux en 8,16 ou 32-bit.

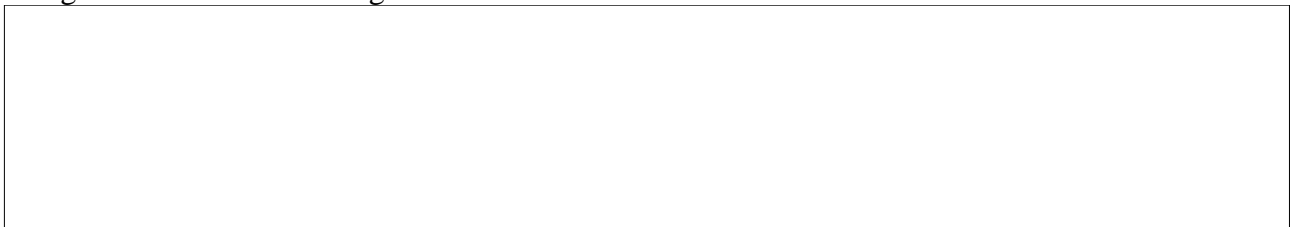
L'histogramme d'une image montre le nombre de fois qu'une valeur de gris est présente dans l'image ceci pour toutes les valeurs de gris. Appuyez sur la touche 'h' (**Analyze>Histogram**) pour afficher l'histogramme d'une image.

a) Ouvrez le *Hoechst.tif* du dossier *04 - what is a digital image*. Afficher l'histogramme. Utilisez les commandes du menu **Process>Math** pour ajouter 100, soustraire 100, diviser par 2 et multiplier par 2. Afficher les différents histogrammes. Entre deux opérations revenir l'image originale sur disque (ctrl + r). Quelles sont les valeurs que vous avez pour *count*, *mean*, *min*, *max* et *mode* (mode est l'intensité la plus fréquente dans l'image - La valeur d'intensité du plus haut sommet de l'histogramme) Appuyez sur le bouton *List* sur l'histogramme de l'image multipliée par 2. Chaque deuxième rangée a la valeur 0. Pouvez-vous expliquer pourquoi?



b) Ouvrir l'image des *cells-16bit.tif*. Afficher l'histogramme. Quelle est la valeur maximale? Astuce – la caméra utilise 12 bits. Notez que l'histogramme utilise 256 intervalles de valeur « Bin » et non pas une barre pour chaque valeur de gris. Appuyez sur le bouton pour voir la liste des valeurs de limite inférieure des intervalles (*bin start*).

c) Que pouvez vous faire afin d'utiliser toute la gamme des valeurs de niveaux de gris disponibles (0-65535) pour l'image *cells-16bit.tif*? Appliquez votre calcul en utilisant **Process>Math>Macro...** et regardez à nouveau l'histogramme.



d) Ouvrir *Hoechst.tif* et la convertir en une image 32 bits (**Image> Type> 32-bit**). Regardez l'histogramme. Multiplier l'image par 2 et regardez l'histogramme de nouveau. Diviser l'image par zéro. Quel est le résultat? Multipliez l'image par -1. Quelles sont les valeurs de pixels maintenant? Divisez-la par *Infinity*.



e) (en option) Rétablir *Hoechst.tif* et la convertir en 32 bits à nouveau. Divisez-la par 255. Quel est le maximum maintenant? Ajouter 1×10^{38} (c'est à dire 10^{38}). Quel est le maximum? Multiplier par 10. Qu'est-ce qu'il se passe?

f) Ouvrez le *7P7.JPG*. Déplacez la souris sur l'image et regardez la barre d'état. Vous devriez voir trois valeurs pour chaque pixel pour les composantes rouge, vert et bleu. Regardez l'histogramme des couleurs à partir **Analyze>Tools>Color Histogram**.

g) Comment mélanger les couleurs à l'écran?

Créer un nouveau HyperStack avec **File>New>Hyperstack...** *Type >8-bits, Display Mode>Color, Width>300, Height>200, Channels>3, Slices>1 et Frame>1* Décocher *Label Image*.

Créer un cercle plein sur chaque canal :

sélectionnez le blanc comme couleur de premier plan en utilisant l'outil color-picker

sur le canal 1 : **Edit>Selection>Specify...**, *Width>150, Height>150, X>30, Y>0, Slice>1*

Cocher **Oval** puis **Edit>Fill** que sur le canal actif

sur le canal 2 : **Edit>Selection>Specify...**, *Width>150, Height>150, X>120, Y>0, Slice>2*

Cocher **Oval** puis **Edit>Fill** que sur le canal actif

sur le canal 3 : **Edit>Selection>Specify...**, *Width>150, Height>150, X>80, Y>50, Slice>3*

Cocher **Oval** puis **Edit>Fill** que sur le canal actif

Image>Color>Channels Tools... et passer en mode Composite. Quelle couleur vous obtenez à partir de mélange rouge et bleu, bleu et vert, bleu et rouge? Quelle couleur vous obtenez à partir de mélange rouge, vert et bleu?

Exercice 4.3 - Comment est représentée l'image par l'ordinateur - les pièges de conversion

Lors de la conversion entre les formats d'image il faut d'être prudent afin de ne pas perdre d'informations ou de ne pas créer des artefacts. Vous devriez toujours conserver une copie de vos images originales.

a) Ouvrez *cells-16bit.tif*. Faites une copie (Shift + d) et multiplier la par 10. Mesurer l'intensité moyenne et totale dans les deux images. Convertir les images en 8 bits et mesurer à nouveau. Dans quelle image l'intensité totale est la plus élevée? Qu'est-ce qu'une personne qui ne connaît que la version 8 bits peut conclure? Pouvez-vous expliquer ce qu'il s'est passé?

b) Décocher l'option *Scale When Converting* dans (**Edit>Options>Conversions**). Convertir de nouveau l'image de 16 bits à 8 bits. Qu'est-ce qu'il se passe. Soustraire la valeur minimale avant de faire la conversion. Qu'est-ce qu'il se passe maintenant? Recocher l'option *Scale When Converting*.

c) Ouvrez *ophrys.tif*. Faites deux copies de l'image *ophrys-1.tif* et *ophrys-2.tif*. Convertir *ophrys-1.tif* à 8 bits à l'aide de **Image>Type>8-bit**. Changer l'option *Weighted RGB Conversions* dans (**Edit>Options>Conversions**). Comparer les intensités des pixels (160, 350) dans les deux images.

Exercice 4.4 - Comment est représentée l'image par l'ordinateur - formats d'image sur le disque

Il existe différents formats de fichiers pour stocker les images. Ils diffèrent dans la manière dont les données et les métadonnées sont organisées. Certains formats utilisent la compression (avec ou sans perte) d'autres pas. En traitement d'images scientifiques, le compression avec perte doit être évitée, s'il n'y a pas de bonne raison de l'utiliser.

Les formats courants sont

tiff - *tagged image file format* - (c) Adobe - sans perte, avec métadonnées - le format préféré d'ImageJ

JPEG EXIF - *Joint Photographic Experts Group (ISO)* format de fichier pour les échanges - avec perte de compression de données

lsm, **stk** - *laser scanning microscope file* - formats propriétaires de Zeiss - l'extension de tiff

FRV - format de fichier image Leica - format propriétaire de Leica - peut contenir plusieurs images multidimensionnelles

a) Chargez *nb.tif*, l'enregistrer au format JPEG de l'image et recharger l'image JPEG enregistrées.

Décocher *Interpolate zoomed images* dans **Edit>Option>Appearance**

Zoomez au maximum et comparer visuellement les deux images. Mesurer et comparer l'intensité dans les deux images.

b) Utilisez le plugin loci-bioformats **Plugin>LOCI>Bio-Formats Importer**

option *Metadata viewing* pour lire les méta-données de *cafe.lsm* dans le dossier *01 - opening images* et les métadonnées de l'une des images du dossier *01 - opening images/arabidopsis*.

Exercice 4.5 - L'image et le monde réel - l'échantillonnage et la résolution

La résolution d'un système optique est la plus petite distance à laquelle deux objets peuvent encore être distingués. Elle est donnée par le critère de Rayleigh:

$$r = \frac{0.61 * \lambda}{NA} \quad \text{où } \lambda \text{ est la longueur d'onde et } NA \text{ l'ouverture numérique de l'objectif.}$$

L'échantillonnage est le processus de conversion d'un signal continu en une suite discrète de valeurs. Un microscope confocal utilise un photomultiplicateur pour construire une image point par point avec une distance configurable entre les points. La taille d'un pixel dépend du grossissement de l'objectif et la taille du pas d'échantillonnage. Un microscope à champ large utilise une caméra CCD dans laquelle chaque élément CCD a une certaine taille et représente une certaine zone de l'objet (selon le grossissement).

Comment doit être l'échantillonnage? Le théorème d'échantillonnage de Nyquist-Shannon :

« *Le pas d'échantillonnage ne doit pas être supérieure à la moitié de la résolution optique* ». Un pas d'échantillonnage plus grand conduit à une perte d'information sur les objets et à un crénelage (*aliasing*), un pas plus petit n'ajoutent pas d'informations.

Selon <http://www.svi.nl/NyquistRate> la distance entre deux pixels doivent être :

$$\Delta x \leq \frac{\lambda_{em}}{4 * NA} \quad \text{dans le cas d'un microscope à champ large. } \lambda \text{ est la longueur d'onde}$$

d'émission et le NA l'ouverture numérique de l'objectif.

$$\Delta x \leq \frac{\lambda_{ex}}{8 * NA} \quad \text{dans le cas d'un microscope confocal. } \lambda \text{ est la longueur d'onde d'excitation}$$

dans ce cas.

La **PSF** *point spread function* est l'image d'un point au travers d'un système optique (une bille à la limite de la résolution). La création d'une image par un système optique peut être décrite comme une convolution entre la fonction objet (l'image réelle idéale) et la PSF.

a) Utiliser l'importateur loci-bioformats pour trouver la longueur d'onde d'excitation et l'ouverture numérique utilisées pour prendre l'image (**sur quelle image?**). Quelle est la résolution optique du système? Quel est le pas d'échantillonnage? L'image a bien été échantillonnée selon Nyquist ou elle est sur-ou sous-échantillonnée?



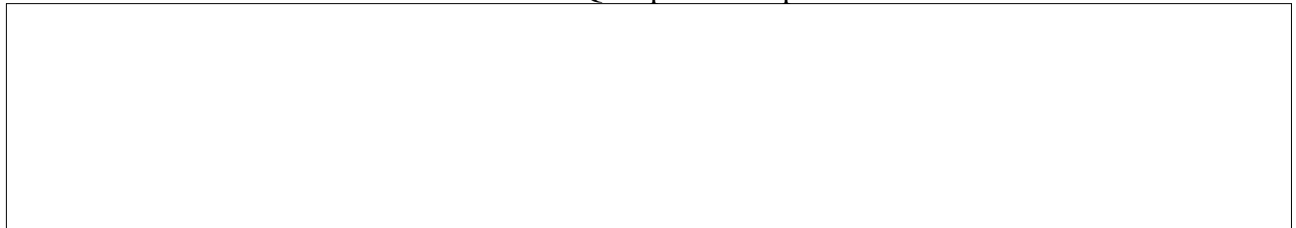
b) Ouvrez *04 - what is a digital image/Bead*. C'est l'image d'une bille fluorescente prise avec un microscope à champ large. Utiliser **Image>Properties** pour entrer les distances correctes d'échantillonnage (Pixel Width=Pixel Height = 64.5nm et Voxel Depth= 160nm). Afficher l'image en 3D en utilisant le Plugin *Volume-viewer*.

c) Ouvrez l'image *04 - what is a digital image/PSF*. Il s'agit d'une PSF calculée pour un microscope à champ large avec $NA = 1,4$ et $\lambda = 530\text{nm}$. Utiliser **Image>Properties** pour entrer les distances correctes d'échantillonnage (Pixel Width=Pixel Height = 64.5nm et Voxel Depth= 160nm). Afficher l'image en 3D en utilisant *Volume Viewer* ou *3D-viewer*.

d) (**en option**) Fabrication d'une image convoluée : prendre une image au milieu du stack PSF et convoluer l'image *bridge.tif* avec elle. Vous pouvez utiliser **Process>FFT>FD Math** operation *Convolve* pour calculer la convolution. Les images doivent avoir la même taille. Agrandir l'image PSF en utilisant **Image>Adjust>Canvas Size...**

Déconvolution : Faire une déconvolution de l'image convoluée (Resultat de l'opération précédente) avec la même image PSF : **Process>FFT>FD Math** operation *Deconvolve*.

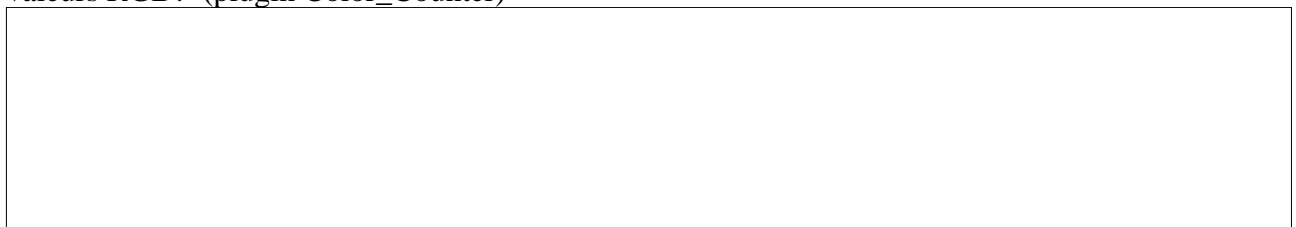
e) (**en option**) Créer votre propre image psf 2d qui se compose d'une petite ligne blanche horizontale. Faire une convolution et une déconvolution. Quel processus pourrait décrire cette PSF?



Exercice 4.6 Image et perception

Lorsque vous comparez les couleurs, les valeurs des intensités ou des tailles des objets visuellement vous devez être très prudent. La perception humaine peut nous jouer des tours.

a) Ouvrez *Spirals.png*. Combien de couleurs différentes il y a dans l'image? Pouvez-vous lister les valeurs RGB? (plugin *Color_Counter*)



b) Ouvrir l'image *whites-illusion.tif*. Quels barres grises sont plus brillantes, à droite ou à gauche? Mesurer les valeurs d'intensité. Pouvez-vous expliquer cela?

c) Ouvrez *lines.tif*. Quelle ligne est la plus longue? Mesurer la longueur.

d) Ouvrez *Ebbinghaus.tif*. Quel point central est le plus grand? mesurer les surfaces des deux points en utilisant un seuillage et la baguette.

e) Ouvrez *Kanizsas-triangle.tif*. Voyez vous le triangle avec les sommets dans les ronds noirs ? Utilisez le seuillage et la baguette pour mesurer sa surface.