



Thème 05 - Réglage de la luminosité et du contraste

Exercice 5.1 - Corrections d'affichage linéaires

Lorsque vous travaillez avec des images, vous aurez souvent besoin d'ajuster la luminosité et le contraste de l'affichage pour voir les détails intéressants. Vous pouvez utiliser l'outil **B & C Image>Adjust>Brightness/Contrast...** Il permet de fixer un minimum et un maximum. Les valeurs inférieures au minimum seront affichées en noir, les valeurs supérieures au maximum en blanc. Les valeurs d'affichage seront calculées par la fonction de transfert : la droite entre (min, 0) et (max, 255) pour les images 8-bit.

a) Ouvrez *bc-adjust.tif* à partir du dossier *05 - brightness and contrast adjustment*. Utilisez l'outil **B & C (Image>Adjust>Brightness/Contrast...)** pour optimiser l'affichage de l'image.

b) Mesurer l'intensité totale (IntDen) dans l'image, **Analyse>Set Measurements, Integrated density**. Changer la luminosité et mesurer à nouveau. Est ce que la valeur change ?

c) Mesurer l'intensité totale (IntDen) dans l'image. Changer la luminosité, appuyez sur le bouton **Apply** et mesurer à nouveau. Est ce que la valeur change ?

d) Appuyez sur le bouton *Auto* plusieurs fois. Appuyez sur le bouton *Reset*. Effectuez une sélection sur l'arrière-plan et appuyez sur le bouton *Auto*. Effectuez une sélection sur le premier-plan et appuyez sur le bouton *Auto*. Qu'est-ce que vous observez?

e) Pouvez-vous décrire comment varie la droite de fonction de transfert d'affichage lorsque vous déplacez le curseur *Brightness* et lorsque vous déplacez le curseur de *Contrast* ?

f) Un autre outil pour changer le contraste et la luminosité est l'outil *Windows/Level*. **Image>Adjust>Windows/Level...** Ici, vous définissez une valeur moyenne et une taille de la fenêtre qui l'entoure. Si vous définissez *Level* à 15 et *Window* à 20, Quelles sont les valeurs min. et max. correspondantes?

Exercice 5.2 - Corrections d'affichage non-linéaires

Dans le cas où des intensités très élevées et très faibles doivent devenir visibles en même temps un réglage non-linéaire de l'affichage est nécessaire, de manière à ce que les petites valeurs deviennent plus grandes sans saturer celles qui sont déjà élevées.

a) Ouvrez *cells.tif* à partir du dossier 05 - *brightness and contrast adjustment*. Essayez avec l'outil B&C de rendre visibles les intensités d'arrière-plan. Qu'advient-il des valeurs brillantes dans les noyaux quand vous faites cela? Utiliser **Process>Math>Gamma** pour procéder à un ajustement non-linéaire. Pouvez-vous rendre visibles les intensités d'arrière-plan, sans saturer les taches lumineuses sur les noyaux?

b) La commande **Process>Math>Gamma** modifie les valeurs de pixel dans l'image. Vous pouvez utiliser la macro GammaCorrectionTool pour modifier l'affichage à l'aide de la fonction gamma, sans modifier les valeurs des pixels. Faites glisser le lien de [GammaCorrectionTool.txt](#) de la page [macro/tools](#) du site d'ImageJ sur la fenêtre ImageJ. Appuyez sur la bouton gamma sur la nouvelle barre d'outil et cliquez sur l'image. Faites glisser la souris pour modifier la valeur du gamma. La fonction est affichée sur l'image. Quelle valeur gamma donne un bon affichage? Astuce: Double-cliquer sur le bouton gamma affiche la valeur du gamma courant. Vous pouvez vous enlever l'affichage de la fonction sur l'image avec ctrl + shift + a.

c) Ajouter la macro GammaCorrectionTool à votre choix de boîtes à outils. Pour ce faire, vous devez enregistrer le fichier dans le dossier *ImageJ/macros/toolsets*. Après remise à jour des menus vous retrouverez le nom de la macro dans le menu boîte à outils (sur le bouton>> en fin de la barre ImageJ).

Exercice 5.3 - Améliorer le contraste

L'outil pour améliorer le contraste se trouve dans **Process>Enhance Contrast**, il a trois fonctions différentes. Lorsqu'aucune options n'est cochée, l'affichage est réglé de manière à ce qu'un pourcentage donné de pixels deviennent saturés. Dans ce cas, les valeurs d'intensité dans l'image ne sont pas modifiées. Lorsque *Normalize* est sélectionné, c'est une fonction d'étirement des contrastes (normalisation). Lorsque *Equalize* est sélectionné c'est un fonction d'égalisation d'histogramme.

a) Ouvrez *cells2.tif* à partir du dossier 05 - *brightness and contrast adjustment*. Utilisez l'histogramme pour trouver le min. et max. des intensités dans l'image. Réglez le min. et max. dans l'outil B & C ,vous pouvez utiliser le bouton *Set*. Est ce que c'est un bon réglage d'affichage?

b) Exécuter **Process>Enhance Contrast** et assurez-vous qu'aucune option ne soit sélectionnée. Entrez 0,5% dans le champ *Saturated Pixel* et appuyez sur OK. Quelles sont valeurs min. et max. qui seront appliquées par l'outil B & C?

c)Afficher l'histogramme de l'image. Exécuter **Process>Enhance Contrast** à nouveau, mais cette fois, sélectionnez l'option *Normalize*. Comparer l'histogramme de l'image résultante avec l'histogramme de l'image originale.

d) Exécuter **Process>Enhance Contrast** à nouveau. Cette fois, sélectionnez *Equalize Histogram*. Faites-le à nouveau, mais maintenez enfoncée la touche Alt tout en appuyant sur le bouton OK. Comparer les histogrammes de l'image originale, de l'image après égalisation et de l'image après égalisation avec la touche alt enfoncée.

e) L'égalisation d'histogramme calcule un histogramme cumulé normalisé, c'est à dire chaque valeur de l'histogramme est remplacée par la somme des valeurs allant jusqu'à cette valeur et les valeurs sont normalisées à la gamme de valeurs disponibles de niveaux de gris . Chaque valeur de niveaux de gris dans l'image est remplacée par sa valeur dans l'histogramme cumulé normalisé.

(en option)

1.Ecrivez une macro qui affiche l'histogramme cumulé de l'image. Conseils:

Plugins>New>Macro pour créer une nouvelle macro.

L'histogramme `h` de l'image peut être calculé en utilisant la commande

```
getRawStatistics(area, mean, min, max, std, h);
```

Vous pouvez utiliser une boucle *for* pour récupérer les valeurs de l'histogramme:

```
for (i=1; i< h.length; i++) {  
}
```

Dans la boucle, vous devez remplacer la valeur `h[i]` par la somme `h[i] + la valeur précédente`.

Pour créer et afficher le tracé, utilisez les commandes *Plot.create* et *Plot.show*. Recherchez les détails sur la page [Macro-Functions](#) de ImageJ (vous pouvez y accéder à partir du bouton **Dev** de la barre d'outil *Startup Macros*).

2. Modifier la macro pour créer et afficher l'histogramme normalisé cumulatif. La formule pour la normalisation est la suivante:

$$ncdf(g) = round\left(\frac{cdf(g) - cdf_{min}}{(M \cdot N) - cdf_{min}} \cdot 255\right)$$

où ***cdf*** est l'histogramme cumulé, ***cdfmin*** la valeur minimale dans l'histogramme cumulé, et ***M*** et ***N*** la largeur et la hauteur de l'image.

3. En plus de tracer l'histogramme normalisé cumulatif, appliquer l'égalisation d'histogramme à l'image en changeant la valeur de chaque pixel avec sa valeur ***ncdf***. Vous pouvez utiliser les fonctions *getWidth()*, *getHeight()*, *getPixel()* et *setPixel()*. Vous pouvez utiliser une boucle imbriquée pour une boucle sur tous les pixels de l'image:

```
for (x=0; x<width; x++) {  
  for(y=0; y<height; y++) {  
    ...  
  }  
}
```

4. Modifier la macro pour utiliser la racine carrée des valeurs lors du calcul de l'histogramme cumulé. Vous avez besoin d'adapter l'étape de la normalisation en conséquence.

Exercice 5.4 Lookup-tables

Nous allons maintenant changer l'affichage de notre image par une table de correspondance des valeurs d'intensité avec des couleurs. Cela se fait par l'utilisation LUT *lookup table*. Une table de correspondance est un tableau qui fait correspondre les 255 valeurs d'intensité à 255 couleurs arbitraires. Les couleurs sont exprimées par la proportion des trois couleurs de base rouge, vert et bleu.

a) Ouvrez *Control Panel* dans des **Plugins>Utilities>Control Panel** (ctrl + shift + u). Dans ce panneau de commande allez dans **Image>Lookup Tables** et tirer ce menu en dehors. Fermer le panneau de commande « parent ». Assurez-vous qu'aucune image ne soit ouverte. Cliquez sur les différentes LUT. Une image montrant les couleurs pour les 255 valeurs d'intensité est affichée. Maintenant, ouvrez *cells2.tif*, faire une égalisation d'histogramme et appliquer une LUT en cliquant de nouveau sur *lookup-tables*.

b) Ouvrir la LUT *Rainbow RGB*. Pouvez-vous dire à quelle couleur la valeur 200 correspond? Quelles sont les composantes RVB de cette couleur (utiliser **Image>Color>Show Lut**)?

c) La LUT *HiLo* est utile pour ajuster l'affichage de l'image. 0 sera affiché en bleu, 255 en rouge et les valeurs entre les deux seront affichées en gris. Regardez la LUT *HiLo*. Utilisez-la en combinaison avec l'outil B&C (Bright/Contrast) pour optimiser l'affichage de l'image *cells2.tif*.

d) Sélectionnez la LUT *Grays*. Utilisez **Image>Color>Edit Lut** pour créer une lookup-table qui affiche 0 en vert, 255 en jaune et les valeurs comprises entre 100 et 120 dans différentes nuances de rouge, de plus en plus clair quand l'intensité augmente. Enregistrez la lookup-table dans le dossier lut, exécutez **Help>Refresh Menus** et appliquez la nouvelle lut à l'image.

Exercice 5.5 Superposition des plusieurs canaux

Une tâche commune en microscopie à fluorescence est de créer une image combinée des différents canaux. La tâche consiste à créer une superposition des différents canaux, à ajuster l'affichage de chaque canal et, éventuellement, à transférer ces paramètres de réglage à une autre image, afin de permettre une comparaison visuelle. Pour cela ImageJ utilise des *hyperstacks* qui permettent de travailler avec des images multidimensionnelles. Les différentes dimensions sont spatiales (x, y et z), temporelle t et les canaux (soit la couleur ou la longueur d'onde).

a) Ouvrez *dapi 3.tif* et *rhod 3.tif*. Exécutez **Image>Color>Merge Channels...** Essayez le bouton *Primary Colors* de la barre d'outils *Lookup Tables* pour changer les couleurs des deux canaux. Utilisez l'outil **Image>Hyperstacks>Channel Tool...** pour afficher ou non les canaux. Utilisez l'outil **B & C** pour optimiser l'affichage des deux canaux indépendamment.

b) Sauvegardez l'hyperstack au format tif. Fermez et le rechargez à nouveau l'hyperstack. Créer une capture couleur, en utilisant la commande *More>Convert to RGB* du *Channel Tool*.

c) Créer un deuxième hyperstack à partir des images *dapi 5* et *rhod 5*. Transférer les réglages d'affichage du premier hyperstack (*dapi 3* et *rhod 3*) au second en utilisant l'option *Propagate* du bouton *Set* de l'outil B&C.

d) Création d'une superposition avec *b2RFP_gemDeltaC2_blue.tif*, *b2RFP_gemDeltaC2_green.tif* et *b2RFP_gemDeltaC2_red.tif* et ajuster l'affichage.

e) Créer un hyperstack à partir des images *dapi 4* et *rhod 4*. Corriger l'alignement à l'aide de sélectionner tout (ctrl+a), couper (ctrl + x) et coller (ctrl + v). Si l'outil de sélection rectangulaire est sélectionnée, vous pouvez maintenant déplacer le canal collé. Après la correction, recadrer l'image pour se débarrasser de la zone vide.

f) Ouvrir les trois stacks *Actine.stk*, *DAPI.stk* et *Gtub.stk*. Concaténer les trois stacks ***Image>Stacks>Tools... Concatenate***. Utilisez ***Image>Hyperstacks>Stack to Hyperstack...*** pour créer une image composite. Veillez à sélectionner le bon ordre des dimensions (*xyzct, channels 3 slices 54, frames 1, Display Composite*).

g) Faire une projection en z du résultat de l'étape f). Qu'est-ce que vous obtenez?